DIE WIRKUNG DES ANTIBIOTIKUMS RIFAMPICIN AUF DEN BEGINN DER ESCHERICHIA COLI RNA POLYMERASE REAKTION

INAUGURALDISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES DOKTORGRADES DES FACHBEREICHS
CHEMIE UND PHARMAZIE
DER LUDWIG MAXIMILIANS UNIVERSITÄT
MÜNCHEN
VORGELEGT VON CHRISTOPH KESSLER
MÜNCHEN 1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535715_0026

DIE WIRKUNG DES ANTIBIOTIKUMS RIFAMPICIN AUF DEN BEGINN DER ESCHERICHIA COLI RNA POLYMERASE REAKTION

INAUGURALDISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES DOKTORGRADES DES FACHBEREICHS
CHEMIE UND PHARMAZIE
DER LUDWIG MAXIMILIANS UNIVERSITÄT
MÜNCHEN
VORGELEGT VON CHRISTOPH KESSLER
MÜNCHEN 1979

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. R. Hartmann

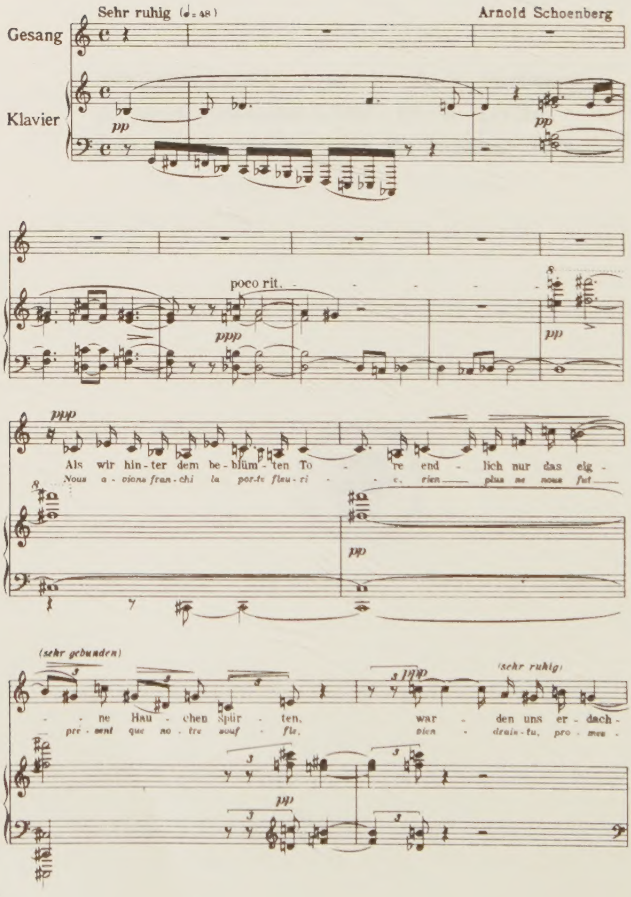
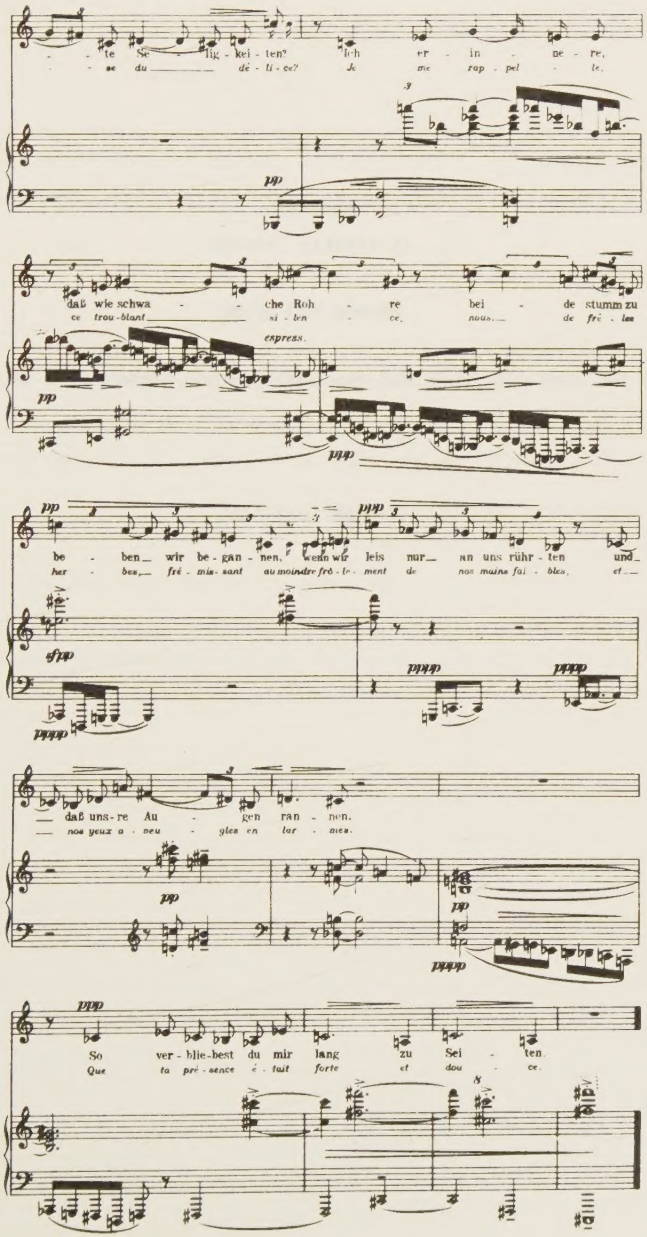
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Zillig

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Für Ilse, Susanne und Franz

XI.


Sehr ruhig (♩= 48)
Arnold Schoenberg
Gesang
Klavier
pp
poco rit.
ppp
Als wir hin - ter dem be - blüm - ten To - re end - lich nur das elg -
Nous a - vions fran - chi la por - te fleu - ri - e, rien plus ne nous fut
(sehr gebunden)
(sehr ruhig)
- ne Hau - chen spür - ten,
pre - ment que no - tre souf - fle,
war - den uns er - dach -
rien drain - tu, pro - mes -

te Se lig - kei - ten?
se du dé - li - ce?
Ich er - in - ne - re,
Je me rap - pel - le,
daß wie schwa - che Roh - re bei - de stumm zu
ce trou - blant si - len - ce, nous de fré - les
espress.
be - ben wir be - gan - nen, wenn wir leis nur an uns rühr - ten und
her - bes, fré - mis - sant au moindre frô - le - ment de nos mains fai - bles, et
daß uns - re Au - gen ran - nen.
nos yeux a - neu - gles en lar - mes.
So ver - blie - best du mir lang zu Sei - ten
Que ta pré - sence é - tait forte et dou - ce.

Dienstag
Nichts. Existiert.

Sechs Uhr abends

...

: die Welt der Erklärungen und Begründungen ist nicht die Welt der Existenz.

...

Jean-Paul Sartre

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1976 bis Dezember 1979 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. G. R. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgeführt.

Herrn S. Lechner danke ich für die intensive Zusammenarbeit bei der Anreicherung der resistenten RNA Polymerase.

Für die präzise und sichere Mitarbeit bei der Durchführung komplizierter Reaktionsabläufe danke ich Herrn H. Ernst und Herrn Dr. W. Zimmermann.

Frl. H. Sieber und Frl. S. Klüpfel möchte ich für die Isolierung vieler DNA-Präparationen danken.

I thank Miß M. Temple for discussing the rif-problem.

Ferner möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern danken, die durch zahlreiche Anregungen und praktische Hilfe diese Arbeit unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 1

Verwendete Materialien 6

1. Bakterien und Phagen 6
2. Enzyme 6
   a. Isolierung von RNA Polymerase aus Escherichia coli 6
   b. Isolierung der Untereinheit Sigma 8
   c. Eichprotein 8
3. Nucleinsäuren 8
4. Nucleotide 8
5. Inhibitoren 9
6. Materialien für chromatographische Verfahren 9
7. Sonstige Chemikalien 10

Angewandte Methoden 11

1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität der RNA Polymerase 11
   a. Standardaktivitätstest für die RNA-Synthese 11
   b. Standardaktivitätstest für die DNTP-Synthese 13
   c. Festlegung der Reaktionsparameter des Standardaktivitätstests 14
   d. Festlegung des Enzym-DNA-Verhältnisses bei der DNTP-Synthese 15
2. Reinigung der Ribonucleosidtriphosphate 17
   a. Reinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie 17
   b. Reinigung durch Trockensäulen-Chromatographie an Polyäthylenimin-Cellulose 18
   c. Reinheitsprüfung der nachgereinigten Ribonucleosidtriphosphate 20

3. Isolierung des ternären Transkriptionskomplexes 23
a. Synthese des ternären Transkriptionskomplexes 23
b. Isolierung des ternären Transkriptionskomplexes 23
4. Dodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 25
5. Proteinbestimmung der Enzymlösungen 26

Ergebnisse

I. RNA- und DNTP-Synthese als Parallelreaktionen 27
1. Einfluß der GTP- und CTP-Konzentration auf das Verhältnis der Synthese von RNA und DNTP 27
2. Einfluß von Rifampicin auf die RNA- und DNTP-Synthese 32
3. Konzentrationsabhängigkeit der Rifampicinwirkung 34
4. Ausmaß der Steigerung der DNTP-Synthese durch Rifampicin 36
5. Einfluß der ATP-Konzentration 43
a. UTP-Abhängigkeit 43
b. ATP-Abhängigkeit 47

II. Einfluß der Temperatur, Protonenkonzentration und Ionenstärke auf die DNTP- und RNA-Synthese 50
1. Einfluß der Temperatur 52
2. Einfluß der Protonenkonzentration 57
3. Einfluß der Ionenstärke 59

III. Identität der Katalyse der Bildung von DNTP bei der abortiven Initiation und der Initiation langkettiger RNA 63
1. Einfluß der Untereinheit Sigma 65
2. Stabilität des Enzym-DNA-Komplexes während der DNTP-Synthese 71
a. Blockierung der Matrize durch den Rifampicin-RNA Polymerase-Komplex 71
b. Heparinsensitivität der DNTP-Synthese 75
3. Analyse des Gleichgewichts zwischen aktiven ind inaktiven Zustandsformen des Enzym-DNA-Komplexes 80
1. Temperaturabhängigkeit der Heparinwirkung auf die DNTP-Synthese 80
2. Aktivierung inaktiver Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes 84
a. Temperaturabhängigkeit der Aktivierung inaktiver Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes 84
b. Reversibilität der Aktivierung inaktiver Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes 92

IV. Einfluß des dritten Nucleotids auf die DNTP-Synthese 98

1. Vergleich der Wirkung von CTP und CMP auf die DNTP-Synthese 101

a. Einfluß von CTP 101

b. Einfluß von CMP 102

2. Einfluß von Rifampicin auf die Reduktion der DNTP-Synthese 106

3. Spezifität der Wirkung von CMP 109

4. Einfluß der CMP-Konzentration 112

5. Einfluß der Temperatur auf die Wirkung von CMP 115

V. Einfluß von RNA auf die Wirkung von Rifampicin 118

A. Stabilisierung des Enzym-DNA-Komplexes durch die *in vitro* RNA-Synthese 119

1a. Wirkung von Rifampicin zu Beginn der *in vitro* RNA-Synthese 120

1b. Einfluß der GTP- und CTP-Konzentration 124

2. Wirkung von Rifampicin während verschiedener Stadien der RNA-Synthese 127

3. Stabilität des isolierten ternären Transkriptionskomplexes gegenüber der Wirkung von Rifampicin 130

B. Einfluß von Rifampicin auf die Bindung exogener RNA an freie RNA Polymerase 136

1. Bindung exogener RNA an freie RNA Polymerase 138

a. Wirkung von exogener RNA auf die RNA-Synthese 138

b. Wirkung von exogener RNA auf die DNTP-Synthese 141

2. Einfluß von Rifampicin auf die Wirkung von exogener RNA 143

3. Spezifität der Schutzwirkung von Rifampicin 146

a. Spezifität der Rifampicin-Wirkung 146

b. Spezifität gegenüber exogener RNA 147

4. Stabilität des Rifampicin-Enzym-Komplexes gegenüber exogener RNA 149

a. Einfluß der Temperatur 150

b. Einfluß der RNA-Einwirkdauer 151

Abschließende Aspekte 157

Literaturverzeichnis 185

Zusammenfassung 208

Abkürzungsverzeichnis 210

Lebenslauf 213

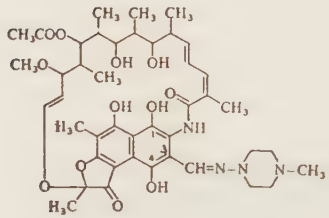
Einführung und Problemstellung

Die Verbindungen der Rifamycine, die wie die Streptovaricine und Tolypomycin zu der Naturstoffklasse der Ansamycine zählen (Prelog und Oppolzer, 1973) und deren wichtigste Abkömmlinge erstmals von Sensi et al. (1959) als Rifamycinkomplex (Sensi et al., 1959b) isoliert wurden, treten als sekundäre Metaboliten des Stoffwechsels von Mikroorganismen auf, die ursprünglich dem Genus der Streptomyceten zugeordnet (Margalith und Beretta, 1960), später aber neu als Norcardia mediterranea klassifiziert wurden (Thiemann et al., 1969).

Die Strukturaufklärung von Rifamycin B mittels chemischer Abbaureaktionen (Oppolzer et al., 1964; Oppolzer und Prelog, 1973) und der Röntgenstrukturanalyse (Brufani et al., 1964) ergab, daß es sich bei der Substanzklasse der Rifamycine um Naphtochinonderivate handelt, die in charakteristischer Weise durch einen aliphatischen Ansa-Ring verbrückt sind. Dabei ist es die herausragendste biologische Eigenschaft der Rifamycine, daß sie das Wachstum vorwiegend gram-positiver Bakterien und Mycobakterien schon in sehr kleinen Konzentrationen inhibieren (vgl. Wehrli, 1977a).

Nun zeigt die Struktur-Wirkungsbeziehung vieler hundert natürlicher und semisynthetischer Rifamycinderivate, daß die Modifikation der Seitenketten an den Kohlenstoffatomen 3 und 4 des Naphtochinongerüsts die biologische Aktivität der Wirkstoffe nur wenig verändert (vgl. Sensi, 1975). Im Gegensatz dazu beeinflussen jedoch strukturelle Änderungen der Seitenketten an diesen Positionen die pharmakokinetischen Eigenschaften der Rifamycine in entscheidendem Ausmaß, was für deren klinische Anwendung als Antibiotika überaus bedeutend ist. So wird bei der Behandlung von Tuberkulose in Verbindung mit anderen antibiotisch wirkenden Substanzen vornehmlich Rifampicin, das 3-(4-methyl piperazinyl)-iminomethyl-Derivat von Rifamycin SV (Maggi et al.,

1965; 1966) als Breitbandantibiotikum in großem Umfang eingesetzt (Binda et al., 1971).



Struktur von Rifampicin (MG=823)

Hartmann et al. (1967) konnten an isolierter DNA-abhängiger RNA-Polymerase aus Escherichia coli zeigen, daß Rifampicin in Prokaryonten im Gegensatz zu anderen Inhibitoren der RNA-Synthese wie Actinomycin (vgl. Kersten und Kersten, 1974) unter in vitro Bedingungen die Bildung langkettiger Ribonucleinsäure direkt durch die Desaktivierung des bakteriellen Enzyms schon in geringen Konzentrationen ($c_{Rif}=10^{-8}$mol/l) inhibiert. Diese Hemmung kommt dadurch zustande, daß das Antibiotikum spezifisch einen äquimolaren Komplex mit dem Enzymprotein bildet (Wehrli et al., 1968; Wyss und Wehrli.,1976).

Somit erweist sich der Wirkstoff nicht nur im medizinischen Bereich bei maßvoller Anwendung als wirksame Waffe zur Bekämpfung bakterieller Infektionen, sondern wird wegen seiner spezifischen inhibitorischen Wirkung auch in vielen biochemischen und mikrobiologischen Laboratorien zur Untersuchung verschiedenartigster Probleme des Transkriptionsprozesses eingesetzt.

Kürzlich beobachteten Johnston und McClure (1976) an λb2 DNA als Matrize, daß E. coli RNA Polymerase in vitro ebenfalls in einer matrizenabhängigen Reaktion bei der Inkubation mit ATP und UTP in Gegenwart von Magnesium-Ionen große Mengen Dinucleosidtetraphosphat synthetisieren kann. Dabei machten die Autoren die überraschende Entdeckung, daß diese Reaktion auch dann ablaufen kann, wenn das freie Enzym mit Rifampicin vorinkubiert worden war. Allerdings werden unter diesen Bedingungen in Anwesenheit des Antibiotikums keine längerkettigen Oligonucleotide gebildet. Auch bei der Inkubation

mit allen vier Ribonucleosidtriphosphaten wird nach der Bindung des Wirkstoffs an die RNA Polymerase sowohl an λb2 DNA (Johnston und McClure, 1976) als auch an T4 DNA (Kessler, 1976) nahezu ausschließlich Dinucleosidtetraphosphat synthetisiert. Diese Wirkung von Rifampicin wurde auch bei der RNA Polymerase aus Micrococcus luteus gefunden (S. Lechner, Dissertiation).

Diese Beobachtungen legen nahe, daß Rifampicin unabhängig von der Herkunft der RNA Polymerase und der Matrize als Inhibitor der Elongation des initierenden Dinucleosidtetraphosphats wirkt und somit keinen der verschiedenen Schritte der Initiationsreaktion (vgl. Chamberlin, 1976) wie die Bildung des stabilen Praeinitiationskomplexes zwischen Enzym und Matrize (Kerrich-Santo und Hartmann, 1974), die Anlagerung des Substrats an diesen binären Enzym-DNA-Komplex (Mangel und Chamberlin, 1974a) oder die kovalente Knüpfung der ersten Phosphodiesterbindung (So und Downey, 1970) blokkiert.

Kessler und Hartmann (1977) vermuteten, daß die Diskrepanz zwischen der bisher angenommenen Wirkungsweise von Rifampicin als Inhibitor einer der Initiationsreaktionen der RNA-Synthese und der von Johnston und McClure (1976) postulierten Wirkung als Hemmstoff des Elongationsvorgangs auf die stark unterschiedliche Anlagerungsgeschwindigkeit des Antibiotikums an die RNA Polymerase in An- und Abwesebheit der Matrize und möglicherweise auch anderer Reaktionskomponenten zurückzuführen ist.

Somit war es von großem Interesse, am Beispiel der pppApU-Synthese zu studieren, wie die Bildung langkettiger Ribonucleinsäure und die von Dinucleosidtetraphosphat zusammenhängt. Gleichzeitig war es ein Ziel der Untersuchungen zu erfahren, welchen Einfluß Rifampicin auf das Ausmaß beider Reaktionen unter Bedingungen ausübt, bei denen die Wirkung des Antibiotikums durch keine kinetischen Barrieren der Anlagerungsreaktion des Wirkstoffs beeinflußt wird. Dabei stellte sich zusätzlich die Frage, in welcher Weise die unter diesen Bedingungen beobachtete Wirkung auf die katalytische Aktivität der RNA Polymerase vom Einfluß der Reaktionsparameter wie der Konzentration der eingesetzten Substrate, der Temperatur, der Protonenkonzentration oder der Ionenstärke abhängt.

Die vermutete Wirkung von Rifampicin als Hemmstoff der Elongationsreaktion der RNA-Synthese hat nun aber zur Voraussetzung, daß die Katalyse der Bildung

von Dinucleosidtetraphosphat mit derjenigen der Initiationsreaktion der RNA-Synthese nicht nur formal, sondern auch bezüglich des Katalysemechanismus identisch ist. Diese Identität war jedoch bisher in Frage gestellt, da die Reihenfolge der Substratanlagerung bei der Initiationsreaktion der RNA-Synthese (Rhodes und Chamberlin, 1975) mit der bei der Bildung von Dinucleosidtetraphosphat (Smagowicz und Scheit, 1977; McClure et al., 1978) nicht übereinzustimmen schien.

Da diese elementare Frage nach der Identität beider Reaktionen sowohl bei den Untersuchungen von Johnston und McClure (1976) als auch von McClure und Cech (1978) über die Rifampicinwirkung offengeblieben war, sollte der Vergleich der Abhängigkeiten der Bildung sowohl von Polyribonucleotiden als auch von Dinucleosidtetraphosphat Hinweise darauf geben, ob die Initiation der RNA-Synthese und die Bildung von Dinucleosidtetraphosphat durch das gleiche aktive Zentrum der E. coli RNA Polymerase katalysiert werden. Dies würde darauf hindeuten, daß diese Reaktionen bis zur Knüpfung der ersten Phosphodiesterbindung identisch sind. Weitere Rückschlüsse über die Übereinstimmung der Katalyse beider Reaktionsabläufe sollte sich auch aus der Charakterisierung desjenigen Reaktionsschrittes ableiten lassen, der für das jeweilige Ausmaß der Syntheserate bestimmend ist.

Dabei hätte die Zurückführung der durch den Rifampicin-RNA Polymerase-Komplex katalysierten matrizenabhängigen Bildung von Dinucleosidtetraphosphat auf die Initiationsreaktion der RNA-Synthese zur Folge, daß diese Reaktion als Modell der Initiation der RNA-Synthese unabhängig von der Weiterreaktion der RNA Polymerase in die Phase der Elongation, Termination und Reinitiation angesehen werden kann.

Darüber hinaus eröffnete die von Johnston und McClure (1976), Kessler (1976) und McClure und Cech (1978) beobachtete nahezu vollständige Blockierung der Elongation des Dinucleosidtetraphosphats zu längeren Oligonucleotiden die Möglichkeit, Rifampicin als Werkzeug zum Studium der auf die Bildung von Dinucleosidtetraphosphat folgenden, nur wenig untersuchten Reaktionsschritte der Elongation des initiierenden Dinucleotids zu längeren Oligonucleotiden (vgl. Krakow et al., 1976) einzusetzen.

Dabei sollte die Analyse der Wirkung des Antibiotikums nicht nur auf die in vitro Synthese langkettiger Ribonucleinsäure, sondern auch auf den Ablauf von Modellreaktionen, die für die Teilschritte der erneuten Substratanlage-

rung und der Produktbildung charakteristisch sind, weiteren Aufschluß über den mechanistischen Ablauf der der Initiation der RNA-Synthese folgenden Teilprozesse der Katalyse der Elongationsreaktion durch Escherichia coli RNA Polymerase geben.

Verwendete Materialien

1. Bakterien und Phagen

Escherichia coli MRE 600 (RNase I^-) und Escherichia coli BM 1175 (rifampicinresistente rpo B-Mutante der Fa. Merck) wurden nach der Vorschrift von Richardson et al. (1964) gezüchtet. Bei der Züchtung wurde Bacto Yeast Extract (Difco Laboratories, Detroit / Michigan, USA) verwendet. Die Bakterien wurden in der späten logarithmischen Phase geerntet und bei $-25^{\circ}C$ aufbewahrt.

T4 Phagen wurden von Frl. H. Sieber und Frl. S. Klüpfel wie bei Kerrich (1973) angegeben gewonnen.

T7 D111 Phagen wurden von Frl. S. Klüpfel analog der Vorschrift von Studier (1969) isoliert.

Die Phagen wurden sofort nach der Isolation zur DNA-Extraktion verwendet.

2. Enzyme

2a. Isolierung von RNA Polymerase aus Escherichia coli

Sensitives E. coli RNA Polymerase Holoenzym wurde aus gezüchteten E. coli MRE 600 (RNase I^-)-Zellen (vgl. Material, Kap. 1) in Anlehnung an die von Burgess und Jendrisak (1975) und Schaller et al. (1972) entwickelten Anreicherungsverfahren isoliert. Die bei dem Anreicherungsgang abweichenden Schritte sind bei Kessler (1976) beschrieben. Fig. Ia zeigt die Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese einer typischen Präparation von E. coli RNA Polymerase Holoenzym.

Sensitives E. coli RNA Polymerase Coreenzym wurde aus E. coli RNA Polymerase Holoenzym nach der Vorschrift von Berg et al. (1971) isoliert. Fig. Ib zeigt die Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der gereinigten E. coli

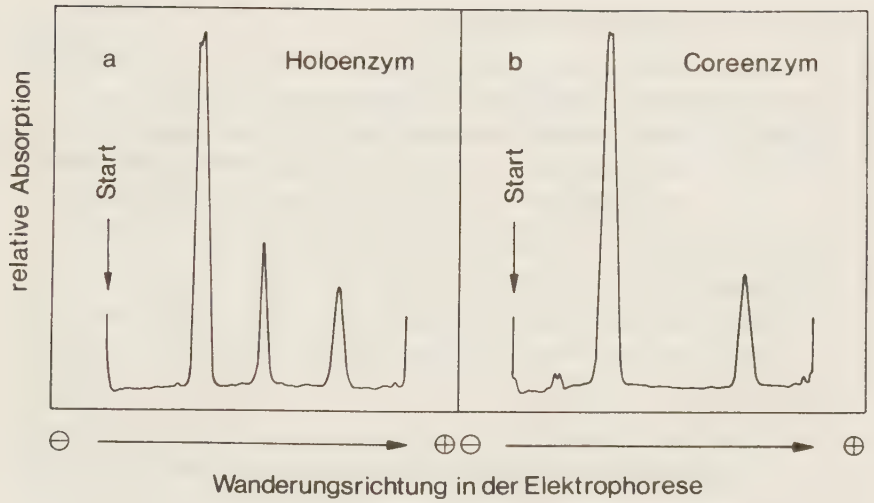


Fig. I Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von E. coli RNA Polymerase Holo- und Coreenzym

22 µg sensitives RNA Polymerase Holoenzym (a) oder 18 µg sensitives RNA Polymerase Coreenzym (b) wurden durch die Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (vgl. Methoden, Kap. 4) in die Untereinheiten aufgetrennt.

RNA Polymerase Coreenzym-Präparation.

Resistentes E. coli RNA Polymerase Holo- und Coreenzym wurde in Zusammenarbeit mit S. Lechner in der gleichen Weise wie die sensitiven Enzyme aus E. coli MB 1175-Zellen (vgl. Material, Kap. 1) präpariert. Dabei zeigt der identische Einbau von radioaktivem UMP in langkettige RNA an T4 oder Lachssperma DNA als Matrize in An- und Abwesenheit von 2 µg/ml Rifampicin, daß beide Enzympräparationen vollständig resistent gegenüber der inaktivierenden Wirkung des Antibiotikums sind.

Alle Enzympräparationen wurden in 10 mmol/l Tris HCl, pH 7.9/25°C, 0.1 mmol/l EDTA, 0,1 mol/l NaCl und 60 % Glycerin bei -25°C aufbewahrt.

2b. Isolierung der Untereinheit Sigma

Die Untereinheit Sigma wurde aus sensitivem E. coli RNA Polymerase Holoenzym nach der von Burgess und Travers (1971) angegebenen Vorschrift von E. coli RNA Polymerase Coreenzym abgetrennt. Die erhaltene Sigma-Präparation enthielt keine Aktivität bezüglich des Einbaus von [^{14}C]UMP in DNTP oder Polynucleotide (vgl. Ergebnisse, Kap. III.1, Fig. 14). Die Aufbewahrung erfolgte bei -25°C in dem in Material, Kap. 2a angegebenen Puffer.

2c. Eichprotein

Rinderserum-Albumin, elektrophoretisch rein (Behringwerke, Marburg)

3. Nucleinsäuren

Lachssperma DNA (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, USA) wurde mittels eines Handhomogenisators in 0.05 mol/l NaCl gelöst (51,6 oE/ml)

Kalbsthymus DNA, Typ V (Sigma Chemie, München), gelöst in 0,05 mol/l NaCl

T4 Phagen DNA wurde von Frl. H. Sieber und Frl. S. Klüpfel aus den gereinigten T4 Phagen (vgl. Material, Kap. 1) nach der bei Kerrich (1973) angegebenen Vorschrift isoliert.

T7 D111 Phagen DNA (vgl. Studier, 1975) wurde von Frl. S. Klüpfel aus den gereinigten T7 D111 Phagen (vgl. Material, Kap. 1) nach der Vorschrift von Thomas und Abelson (1966) isoliert.

T7 Phagen DNA wurde von S. Lechner zur Verfügung gestellt.

Lösliche RNA aus Hefe, Typ XI (Sigma Chemie, München; Chargennummer: 98B-8050)

Ribosomale 16S und 23S RNA aus E. coli (Boehringer, Mannheim; Chargennummer: 1357403)

R17 Phagen RNA (Boehringer, Mannheim; Chargennummer: 11882021)

Polyadenylsäure, Kalium-Salz, Typ I (Sigma Chemie, München; Chargennummmer: 36C-0266)

4. Nucleotide

Die unmarkierten Ribonucleosid-5'-triphosphate (Boehringer, Mannheim; Chargennummer: ATP/70634927, GTP/1156424, CTP/1456217, UTP/1367552) wurden in

H_2O gelöst (7,5 mmol/l), und mit 1 mol/l NaOH ein pH-Wert von 7,0 eingestellt.

Die unmarkierten Ribonucleosid-5'-monophosphate (Sigma Chemie, München; Chargennummer: AMP/87C-7090, GMP/113C- 2080, CMP/15C-0283, UMP/117B-2870) wurden in H_2O gelöst (10 mmol/l), und, falls notwendig, mit 1 mol/l NaOH ein pH-Wert von 7,0 eingestellt.

8-[^{14}C]ATP (46 µCi/µmol) und 2-[^{14}C]UTP (49 µCi/µmol) (New England Nuclear, Frankfurt) wurden in 50 % äthanolischer Lösung zur Trockne eingeengt und mit unmarkierter ATP- bzw. UTP-Lösung aufgenommen (Endkonzentration: 5 mmol/l; spezifische Aktivität, wenn nicht anders angegeben: 2 µCi/µmol).

5,6-[^{3}H]UTP (30 Ci/mmol) (Schwarz/Mann, Becton Dickinson, Heidelberg) wurde in 50 % äthanolischer Lösung zur Trockne eingeengt und mit unmarkierter UTP-Lösung aufgenommen (Endkonzentration: 5 µmol/l; spezifische Aktivität: 10 µCi/nmol).

5. Inhibitoren

Rifampicin war ein Geschenk von Gruppo Lepetit, Milano, Italia. Das Antibiotikum wurde in H_2O gelöst (Stammlösung: 400 µg/ml) und vor Licht geschützt aufbewahrt.

Heparin, Grade I (Sigma Chemie, München; Chargennummer: 46C-0035)

6. Materialien für chromatographische Verfahren

Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Sverige)

Bio-Gel A5m, 100-200 mesh (Bio-Rad Laboratories, München)

Polyäthylenimin Cellulose für die Säulenchromatographie (Merck, Darmstadt)

Dowex AG 1x8 (Cl^-), 200-400 mesh und Dowex AG 50 Wx8 (H^+), 200-400 mesh (Serva, Heidelberg)

3MM Chromatographiepapier (Whatman, Springfield Mill, England); bezogen über Hormuth und Vetter, Wiesloch/Baden

Nylon-Schlauchfolie 30 mm (ICN Pharmaceuticals, Eschwege)

7. Sonstige Chemikalien

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 2-Mercaptoäthanol (Fluka, Eschborn/Taunus)

N-2-Hydroxyäthyl-piperazin-N'-2-äthansulfonsäure, Dithioerythrit (Sigma Chemie, München)

Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, Cromassie Brilliant Blue G250, Agarose (Serva, Heidelberg)

Dimethylaminopropionitril (Merck-Schuchardt, München)

Folin-Ciocalteu-Phenolreagens, Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz, Bromphenolblau, Peroxydisulfat, Lithiumchlorid, Lithiumhydroxid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt)

Bariumchlorid (Riedel-de Haën, Hannover)

Polymin P war ein Geschenk der Fa. BASF, Ludwigshafen

Polyäthylenglycol 20 000 (Roth, Karlsruhe)

Zur Dialyse wurden Visking Dialyseschläuche (Serva, Heidelberg) verwendet.

Alle übrigen Substanzen waren vom besten käuflichen Reinheitsgrad.

Alle Lösungen wurden unter Verwendung von bidestilliertem Wasser hergestellt.

Angewandte Methoden

1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität der RNA Polymerase

1a. Standardaktivitätstest für die RNA-Synthese

Vorinkubationslösung

20 µl der Salzmischung A aus

10 µl 1 mol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C
10 µl 2 mmol/l DTE
10 µl 35 mmol/l $MgCl_2$
10 µl 1,6 mol/l KCl
40 µl H_2O

10 µl 0,20 mg/ml RNA Polymerase Holoenzym

20 µl 15,0 oD T4 Phagen DNA

Die Vorinkubationslösung enthielt somit nach Zugabe der letzten Komponente 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C, 0,1 mmol/l DTE, 1,75 mmol/l $MgCl_2$, 80 mmol/l KCl, 40 µg/ml RNA Polymerase Holoenzym und 300 µg/ml T4 DNA.

Substratlösung

20 µl der Salzmischung B aus

15 µl 1 mol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C
15 µl 2 mmol/l DTE
70 µl 70 mmol/l $MgCl_2$
15 µl 1,6 mol/l KCl

10 µl 7,5 mmol/l ATP

10 µl 7,5 mmol/l GTP

10 µl 7,5 mmol/l CTP

10 µl 5,0 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol)

Die Substratlösung enthielt somit nach Zugabe der letzten Komponente 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C, 0,1 mmol/l DTE, 16,0 mmol/l $MgCl_2$, 80 mmol/l KCl, je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP.

Die Testkomponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge bei 0°C zusammenpipettiert. Nach der Inkubation sowohl der Vorinkubationslösung als auch der Substratlösung für 10 min bei 25°C wurde die Reaktion in der Weise gestartet, daß 50 µl Substratlösung zur Vorinkubationslösung pipettiert wurde. Wenn nicht anders angegeben, wurde nach 10, 20 und 30 min jeweils 25 µl entnommen und auf die Startlinie eines 4 cm breiten und 21 langen Streifens Whatman 3MM Chromatographiepapier, das mit 0,1 mol/l EDTA-Lösung vorbesprüht war, aufgetragen.

Nach dem Trocknen an der Luft für 20 min wurden die Chromatogramme durch eine aufsteigende Chromatographie (Laufstrecke 16 cm) in einem WASP-Fließmittel (Wasser:gesättigte Ammonsulfatlösung:iso-Propanol = 18:20:2; die Mischung enthielt 5 mmol/l EDTA) entwickelt. Nach dem Trocknen unter einer Rotlichtlampe für 1 h wurden die entwickelten Chromatoggamme in solche Streifen geschnitten, daß die verschiedenen RNA-Produkte und das eingesetzte markierte UTP voneinander getrennt bestimmt werden konnten.

Anschließend wurden die Streifen in der Weise in ein Zählgläschen überführt, daß sie an der zylindrischen Wand anlagen. Danach wurde jeweils etwa 10 ml Szintillationsflüssigkeit zugefügt, die 50 mg 1.4-bis-2-(5Phenyloxazolyl)-benzol (POPOP) und 4g 2.5-Diphenyloxazol (PPO) in 1 l Toluol enthielt. Die Radioaktivität der einzelnen Proben wurde in einem ISO CAP 300, Liquid Scintillation Counter durch jeweils zehnminutige Messung bestimmt.

Die Auswertung erfolgte in der Weise, daß in Anlehnung an Johnston und McClure (1976) und Kessler (1976)

die Radioaktivität an der Auftragstelle mit einem R_F-Wert zwischen -0,05 und 0,05 den Polynucleotiden

die Radioaktivität mit einem R_F-Wert zwischen 0,05 und 0,25 den Trinucleotiden

die Radioaktivität mit einem R_F-Wert zwischen 0.25 und 0,55 den Dinucleotiden

die Radioaktivität oberhalb des R_F-Werts von 0,55 den Mononucleotiden

zugeordnet wurde.

Der in den verschiedenen Bereichen auftretende unterschiedliche Leerwert, jeweils ermittelt durch graphische Extrapolation auf t = 0, wurde von den Meß-

werten abgezogen.

1b. Standardaktivitätstest für die DNTP-Synthese

Vorinkubationslösung

20 µl der Salzmischung A aus

10 µl 1 mol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C
10 µl 2 mmol/l DTE
10 µl 35 mmol/l $MgCl_2$
10 µl 1,6 mol/l KCl
10 µl 80 µg/ml Rifampicin (bzw. H_2O)
30 µl H_2O

10 µl 0,20 mg/ml RNA Polymerase Holoenzym

20 µl 15,0 oD T4 Phagen DNA

Die Vorinkubationslösung enthielt somit nach Zugabe der letzten Komponente 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C, 0,1 mmol/l DTE, 1,75 mmol/l $MgCl_2$, 80 mmol/l KCl, 40 µg/ml RNA Polymerase Holoenzym, 300 µg/ml T4 DNA und 4µg/ml Rifampicin. Bei der Bestimmung der DNTP-Syntheseraten in Abwesenheit von Rifampicin wurde an Stelle von 10 µl 80 µg/ml Rifampicin 10 µl H_2O zugegeben.

Substratlösung

20 µl der Salzmischung B aus

15 µl 1 mol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C
15 µl 2 mmol/l DTE
70 µl 70 mmol/l $MgCl_2$
15 µl 1,6 mol/l KCl

10 µl 7,5 mmol/l ATP

10 µl 5,0 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol)

20 µl H_2O

Als Substrate wurden bei der DNTP-Synthese, sofern nicht anders angegeben, doppelt nachgereinigte Ribonucleosidtriphosphate (vgl. Methoden, Kap. 2) eingesetzt.

Die Durchführung und Auswertung des Standardaktivitätstests für die DNTP-Synthese erfolgte analog dem Standardaktivitätstest für die RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) lediglich mit der Abwandlung, daß das freie Enzym in der Salzmischung A vor der Zugabe der T4 DNA zusätzlich für 10 min bei 25°C in An- oder Abwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin vorinkubiert wurde.

1c. Festlegung der Reaktionsparameter des Standardaktivitätstests

Für die Bestimmung der Syntheseraten der RNA- bzw. DNTP-Bildung im Standardaktivitätstest (vgl. Methoden, Kap. 1a und 1b) wurde die Temperatur von 25°C gewählt. Bei dieser Temperatur liegt das Gleichgewicht zwischen inaktiven und aktiven Praeinitiationskomplexen sowohl im Falle der RNA-Synthese (Zillig et al., 1970) als auch der DNTP-Bildung (vgl. Ergebnisse, Kap. III, 3.2) vollständig auf der Seite der aktiven Komplexe. Die Einstellung dieses vorgelagerten Gleichgewichts ist bei 25°C nach der zehnminutigen Vorinkubationsperiode (vgl. Methoden, Kap. 1a und 1b) vollständig abgelaufen (Kerrich-Santo und Hartmann, 1974) und beeinflußt daher bei dieser Temperatur nicht den Verlauf der eigentlichen katalytischen Reaktionsschritte.

Die Wahl dieser gegenüber normalen in vivo Wachstumsbedingungen von E. coli Zellen reduzierten Temperatur hat einerseits den Vorteil, daß die Bestimmung beispielsweise der Verzögerungsphasen bei der Anlagerung von Rifampicin an den Synthesekomplex (vgl. Ergabnisse, Kap. V.A) oder der Wirkung von CMP (vgl. Ergebnisse, Kap. IV) bei 25°C besser als bei 37°C möglich ist. Andererseits sind aber auch die übrigen Befunde über die Rifampicinwirkung nur bei dieser Temperatur mit den Experimenten von Kerrich-Santo und Hartmann (1974), die ebenfalls bei 25°C durchgeführt worden sind, vergleichbar.

Die Abhängigkeit der RNA- bzw. DNTP-Synthese von der Protonenkonzentration zeigt ein Maximum bei etwa pH 8 bei 25°C (vgl. Ergebnisse, Kap. II.2). Daher wurde der pH-Wert im Standardaktivitätstest auf 7,9/25°C festgelegt.

Die KCl-Abhängigkeit der DNTP-Synthese (vgl. Ergebnisse, Kap. II.3; McClure et al., 1978) zeigt, daß die Bildung von DNTP optimal bei niedriger Ionenstärke katalysiert wird. Um Anschluß an die Messungen von Kerrich-Santo und Hartmann (1974) über die Rifampicinwirkung zu erhalten, wurde die KCl-Konzentration auf 80 mmol/l festgelegt.

Aus dem gleichen Grund wurde auch eine $MgCl_2$-Endkonzentration von 8,9 mmol/l gewählt. Bei dieser $MgCl_2$-Konzentration wird die DNTP-Synthese optimal katalysiert (McClure et al., 1978).

Die DTE-Konzentration betrug 0,1 mmol/l, da bei dieser Konzentration die RNA Polymerase ausreichend vor der Oxydation von Sulfhydrylgruppen (vgl. Lill und Hartmann, 1973) geschützt ist.

1d. Festlegung des Enzym-DNA-Verhältnisses bei der DNTP-Synthese

Johnston und McClure (1976) zeigten, daß die DNTP-Synthese eine matrizenabhängige Reaktion ist. Wie die Versuche von Stahl und Chamberlin (1977) über die ebenfalls matrizenabhängige RNA-Synthese verdeutlichen, hängt die Spezifität der Bildung langkettiger RNA und somit der vorausgehenden Bindung der RNA Polymerase an die Matrize entscheidend von Enzym-DNA-Verhältnis ab. Um sicherzustellen, daß auch bei der DNTP-Synthese die Bindung der RNA Polymerase nur an die DNA-Bindungsbereiche mit der höchsten Bindungsaffinität stattfindet, wurde die DNA-Konzentration in der Weise festgelegt, daß bei der vorgegebenen Enzymkonzentration von 20 µg/ml die Matrize im Überschuß vorhanden ist.

Dies gewährleistet, daß unspezifische Bindungsreaktionen des Enzyms an die DNA weitgehend ausgeschlossen sind.

Während in Abwesenheit der Matrize kein DNTP gebildet wird, steigt die DNTP-Syntheserate bei der Erhöhung der DNA-Konzentration zunächst linear an (Fig. IIa). Bei einer DNA-Konzentration von etwa 60 µg/ml knickt die Kurve ab und steigt bei höheren Konzentrationen nur noch in sehr geringem Umfang an. Die Beobachtung, daß die DNA-Abhängigkeit der DNTP-Synthese mit T4 DNA als Matrize einer Sättigungskurve entspricht, ist ein Argument dafür, daß diese matrizenabhängige Reaktion spezifisch ist. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Johnston und McClure (1976) und McClure et al. (1978) an verschiedenen Restriktionsfragmenten von λb2 DNA.

Da bei einer Konzentration von 150 µg/ml T4 DNA die DNTP-Syntheserate bei der Erhöhung der DNA-Konzentration nur noch in geringem Umfang ansteigt, also die Matrize im Überschuß vorhanden ist, wurde diese Konzentration an T4 DNA bei der Durchführung des Standardaktivitätstest der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1b) verwendet.

Wie die entsprechende DNA-Abhängigkeit der RNA-Synthese an T4 DNA im Einschub von Fig. IIa zeigt, wird die Sättigung des Systems bei dieser Reaktion schon bei kleineren DNA-Konzentrationen (c_{DNA} = 30 µg/ml) erreicht. Dies bedeutet, daß auch die RNA-Synthese an T4 DNA bei der Standardtestkonzentration von 150 µg/ml unter optimalen Bedingungen abläuft. Die bei der RNA-Synthese beobachtete Sättigung bei der vorgegebenen Enzymkonzentration von 20 µg/ml durch eine geringere DNA-Konzentration ist in der Weise erklär-

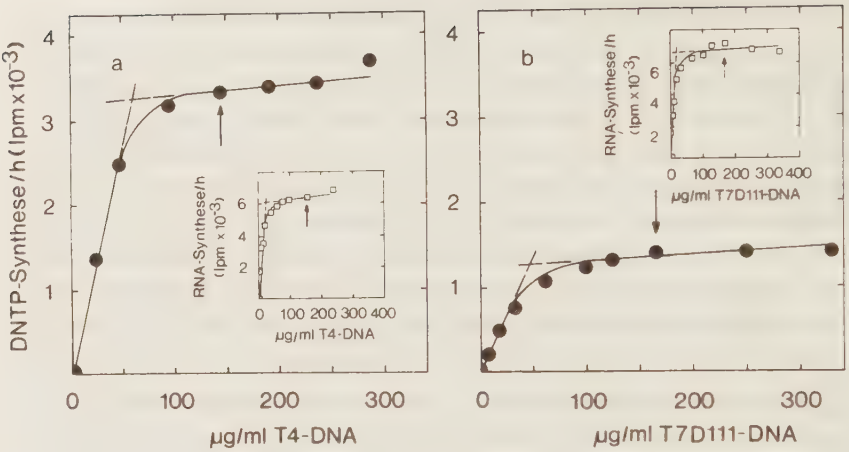


Fig. II DNA-Abhängigkeit der DNTP- und RNA-Synthese

a. T4 DNA

Zur Bestimmung der DNTP-Syntheserate wurde unter Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1b) je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym nach der Vorinkubation für 10 min bei 25°C in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin mit 0 bis 28,7 µg T4 DNA versetzt (result. Vol. der Vorinkubationslösungen je 50 µl). Die DNA-Konzentration der jeweiligen Vorinkubationslösungen entsprach der doppelten der auf der Abszisse angegebenen Konzentration. Nach der weiteren Inkubation für 10 min bei 25°C erfolgte der Start der DNTP-Synthese durch Zugabe von jeweils 50 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen 1,2 mmol/l ATP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Aus dem zeitlichen Verlauf des Einbaus von [^{14}C]UMP in DNTP während 30 min wurde die jeweils als Syntheserate/h angegebene DNTP-Reaktionsgeschwindigkeit (●) bestimmt.
Die Bestimmung der RNA-Syntheserate erfolgte in gleicher Weise wie bei der DNTP-Synthese lediglich mit den Unterschieden, daß das freie Enzym in Abwesenheit von Rifampicin mit den steigenden Mengen an DNA inkubiert wurde, und die Substratlösungen zusätzlich je 1,2 mmol/l GTP und CTP enthielten. Die im Einschub jeweils als Syntheserate/h angegebene RNA-Reaktionsgeschwindigkeit (□) wurde durch den Einbau von [^{14}C]UMP in RNA innerhalb 10 min bestimmt.

b. T7 D111 DNA

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen von Fig. IIa mit Ausnahme der Änderungen identisch, daß einerseits an Stelle von 0 bis 28,7 µg T4 DNA 0 bis 32.5 µg T7 D111 DNA verwendet wurde, andererseits sowohl bei der DNTP- als auch bei der RNA-Synthese Substratlösungen verwendet wurden, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielten.

bar, daß im Gegensatz zur DNTP-Synthese bei der Bildung langkettiger RNA die Bindung von freier RNA Polymerase durch den Übergang des jeweils initiierenden Enzyms in die Elongationsphase immer wieder neu möglich ist.

Die DNA-Abhängigkeit der DNTP-Synthese an T7 D111 DNA (Fig.IIb) entspricht derjenigen an T4 DNA (vgl. Fig. IIa). Wiederum wird in Abwesenheit der Matrize kein DNTP gebildet. Bei der Erhöhung der DNA-Konzentration steigt die DNTP-Syntheserate wiederum linear an und knickt bei einer Konzentration von etwa 50 µg/ml ab. Oberhalb dieser Konzentration ist analog zur DNTP-Synthese an T4 DNA nur ein sehr geringer weiterer Anstieg der Syntheserate zu beobachten.

Die DNA-Abhängigkeit der RNA-Synthese an T7 D111 DNA (Einschub von Fig. IIb) zeigt, daß bei dieser Reaktion auch an T7 D111 DNA analog der RNA-Bildung an T4 DNA Sättigung schon bei geringeren DNA-Konzentrationen eintritt (c_{DNA}= 20 µg/ml).

Somit läuft an T7 D111 DNA als Matrize nicht nur die DNTP-Synthese, sondern auch die RNA-Synthese bei der Standardtestkonzentration von 165 µg/ml T7 D111 DNA unter optimalen Bedingungen ab.

2. Reinigung der Ribonucleosidtriphosphate

2a. Reinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie

Die weitere Reinigung der unmarkierten, käuflichen Ribonucleosidtriphosphate ATP, GTP, CTP und UTP (vgl. Material. Kap. 4) erfolgte zunächst in Anlehnung an Lehmann et al. (1958) und Krakow und Fronk (1969) durch Säulenchromatographie an dem Anionenaustauscher Dowex 1x8 (Cl^-).

Dazu wurden je 2 ml 100 mmol/l käufliches Ribonucleosidtriphosphat (etwa 200 µmol), mit 1 mol/l NaOH auf pH 7 eingestellt, auf eine mit H_2O gewaschene Dowex 1x8 (Cl^-) Anionenaustauschersäule, 200 - 400 mesh (2,9x15 cm; V= 44 cm^3) aufgetragen. Durch Waschen mit 0,01 mol/l HCl + 0,08 mol/l LiCl (ATP), 0,01 mol/l HCl + 0,15 mol/l LiCl (GTP), 0,01 mol/l HCl + 0,06 mol/l LiCl (CTP) oder 0,01 mol/l HCl + 0,15 mol/l LiCl (UTP) wurden verunreinigende Ribonucleoside, Ribonucleosidmono- und -diphosphate und bei kleineren Ionenstärken als das zu reinigende Ribonucleositriphosphat eluierende Ribonucleosidtriphosphate mit anderen Basenteilen eluiert. Die Elution des zu reinigenden Ribonucleosidtriphosphats erfolgte anschließend mit 0,01 mol/l

HCl + 0,13 mol/l LiCl (ATP), 0,01 mol/l HCl + 0,3 mol/l LiCl (GTP), 0,01 mol/l HCl + 0,09 mol/l LiCl (CTP) oder 0,01 mol/l HCl + 0,25 mol/l LiCl (UTP).

Die jeweiligen Gipfelfraktionen wurden vereinigt und durch Ausfällen mit $BaBr_2$ in H_2O/Äthanol (1:1) bei 0°C und anschließende Behandlung mit Dowex AG 50 Wx8 (Na^+)-Kationenaustauscher, 200 - 400 mesh, analog der Vorschrift von Lehmann et al. (1958) lediglich mit der Abwandlung konzentriert, daß das ausgefällte Barium-Salz gefriergetrocknet wurde.

Die Ausbeuten betrugen, bezogen auf die verunreinigte Ausgangssubstanz, 59 % (ATP), 61 % (GTP), 70 % (CTP) und 67 % (UTP).

Die Reinigung von CMP durch Ionenaustausch-Chromatographie erfolgte analog den Ribonucleosidtriphosphaten lediglich mit dem Unterschied, daß die Elution mit 0,04 mol/l HCl erfolgte. Die Ausbeute betrug wahrscheinlich auf Grund der besseren Löslichkeit des Barium-Salzes selbst bei -25°C in H_2O/Äthanol (1:1) bei der abschließenden Konzentrierung nur 19 %.

2b. Reinigung durch Trockensäulen-Chromatographie an Polyäthylenimin-Cellulose

Anschließend wurden die durch Ionenaustausch-Chromatographie partiell gereinigten Ribonucleotide durch Chromatographie an Polyäthylenimin-Cellulose nachgereinigt.

Durch Chromatographie an Polyäthylenimin-Cellulose können die verschiedenen Ribonucleosidtriphosphste voneinander getrennt werden (Randerath und Randerath, 1964; 1967). Da eine Apparatur für Hochdruckflüssigkeitschromatographie nicht zur Verfügung stand (vgl. Oen und Wu, 1978), erfolgte die präparative Reinigung der vorgereinigten Ribonucleosidtriphosphate mittels der Trockensäulen-Chromatographie (Loev et al., 1965; 1967). Diese Methode erlaubt die Übertragung guter dünnschichtchromatographischer Trennungen mit kleinen Substanzmengen auf einen präparativen Maßstab. Dabei werden die aufgetragenen Substanzen mit ähnlichen R_F-Werten wie bei der Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt (McDonald und Rempas, 1977). Ein Nachteil der Methode ist allerdings die geringere Entwicklungsgeschwindigkeit und die schlechtere Auflösung.

Die Durchführung der Chromatographie erfolgte in der Weise, daß auf die Verschlußstelle eines unten abgeklemmten Nylonschlauchs (30 mm, l = 40 cm)

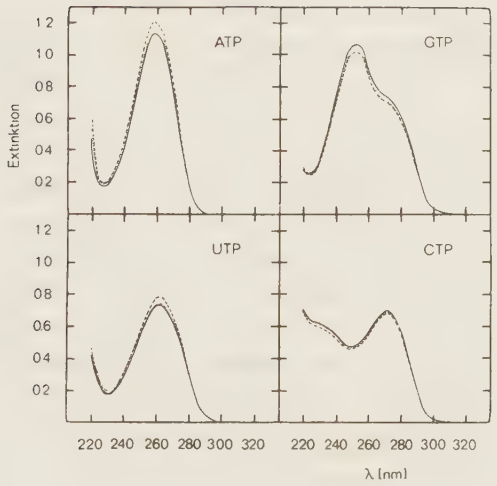


Fig. III Vergleich der Ultraviolett-Absorptionsspektren der Ribonucleosidtriphosphate während der verschiedenen Stufen des Reinigungsverfahrens

Die Ultraviolettabsorption jeweils 75 µmol/l neutraler Lösungen von käuflichen (——), durch Chromatographie an Dowex AG 1x8 (Cl^-) (- - -) und zusätzlich durch Chromatographie an PEI- Cellulose (·····) nachgereinigten Ribonucleosidtriphosphaten wurde im Bereich von λ = 220–320 nm bestimmt.

ein Wattebausch gelegt wurde. An dieser Stelle des Nylonschlauchs wurden mit einer Nadel Luftlöcher durchgestoßen. Anschließend wurde trockenes PEI-Cellulosepulver eingefüllt. Mit einem Vibrator, der an der Rohrseite entlang geführt wird, wurde die Füllung verdichtet, so daß schließlich eine Säulenlänge von 25 cm entstand. Das so verfestigte Chromatographierohr wurde mit zwei Klammern eingespannt. Danach wurde auf die Oberfläche der Füllung ein passendes Filterpapier gelegt und jeweils 0,5 ml der zu reinigenden, wässrigen Ribonucleosidtriphosphat-Lösungen aufgetragen, deren Konzentration je 100 µmol/l betrug (aufgetragene Menge etwa je 50 µmol). Anschließend wurde die Säule mit 1,6 mol/l LiCl so lange eluiert, bis das Laufmittel das untere Ende der Füllung erreicht hatte. Eine Elution erfolgte zu diesem Zeitpunkt

nicht. Die beiden Schlauchenden entsprechen hierbei der Start- und Frontlinie in der Dünnschicht-Chromatographie; ihr Abstand einer R_F-Einheit.

Die Detektion der zu reinigenden Nucleotide erfolgte durch Bestrahlung mit kurzwelligem Ultraviolett-Licht (λ = 254 nm). Der R_F-Wert für ATP betrug 0,55 - 0,65, für GTP 0,45 - 0,55, für CTP 0,70 - 0,80 und für UTP 0,80 - 0,90. Die die einzelnen Ribonucleosidtriphosphate enthaltenden Zonen wurden ausgeschnitten und mit 2 mol/l LiCl eluiert. Das Eluat wurde mit dem gleichen Volumen H_2O versetzt und durch Ausfällen mit $BaCl_2$ in H_2O/Äthanol (1:1) und anschließender Behandlung mit Dowex AG 50 Wx8 (Na^+) analog der Vorschrift von Lehmann et al. (1958) wiederum lediglich mit der Abwandlung konzentriert, daß das ausgefällte Barium-Salz gefriergetrocknet wurde.

Die Ausbeuten betrugen 59 % (ATP), 51 % (GTP), 53 % (CTP) und 67 % (UTP).

Die nahezu vollständige Übereinstimmung der Ultraviolett-Absorptionsspektren bei pH 7 von jeweils 75 µmol/l enthaltenden Lösungen der Ribonucleosidtriphosphate nach den verschiedenen Stadien der Reinigung (Fig. III) zeigt, daß die Lösungen nahezu frei von Fremdsubstanzen wie z.B. Bromid-Ionen sind, die durch die Reinigungsoperationen eingeschleppt werden konnten.

2c. Reinheitsprüfung der nachgereinigten Ribonucleosidtriphosphate

Da die Konzentrationen der verunreinigenden Ribonucleosidtriphosphate so gering sind, daß sie durch herkömmliche analytische Trennverfahren wie beispielsweise die analytische Dünnschicht- oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie an PEI-Cellulose (vgl. Randerath und Randerath, 1964; 1967) direkt nicht nachgewiesen werden können, mußte die zunehmende Reinheit der Ribonucleosidtriphosphate nach den verschiedenen Schritten der Reinigung durch eine Methode nachgewiesen werden, die selbst noch auf geringste Nucleotid-Konzentrationen anspricht.

Der Vergleich der DNTP-Syntheseraten in Ab- und Anwesenheit von Rifampicin (vgl. Ergebnisse, Kap. I.1,Fig. 2und Kap. I.2,Fig. 3) zeigt, daß die Bildungsrate von DNTP im rifampicinfreien System sehr stark von der Konzentration der Nucleosidtriphosphate GTP und CTP abhängt. Im Gegensatz dazu läuft die Synthese dieses Produkts in Anwesenheit des Antibiotikums nahezu konzentrationsunabhängig ab. Das Ausmaß der Steigerung der DNTP-Synthese wird daher allein durch die DNTP-Bildungsrate im rifampicinfreien System bestimmt und hängt somit ebenfalls in gleicher Weise von der GTP- und CTP-Konzentra-

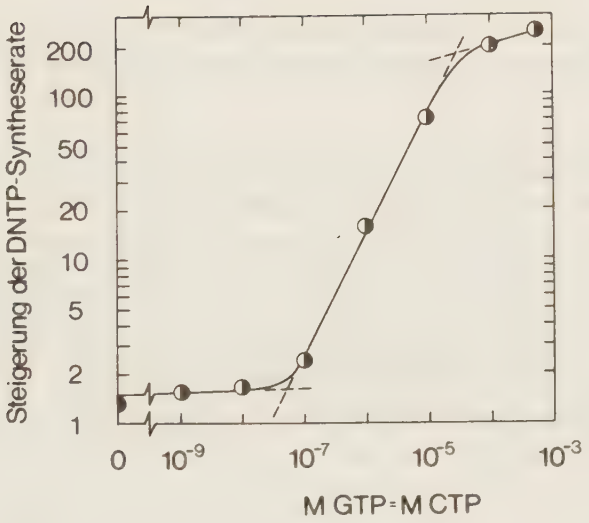


Fig. IV Einfluß der GTP- und CTP-Konzentration auf die Steigerung der DNTP-Syntheserate

Die bei den auf der Abszisse angegebenen Konzentrationen von GTP und CTP aus Fig. 2 und 3 (vgl. Ergebnisse, Kap. 1 und 2) berechneten Quotienten der jeweiligen DNTP-Syntheseraten in An- und Abwesenheit von 2 µg/ml Rifampicin wurde doppelt logarithmisch als Funktion der Konzentration von GTP und CTP aufgetragen.

tion ab.

Dieser Zusammenhang bietet eine Möglichkeit, die Konzentration von GTP und CTP auf eine neue Weise zu bestimmen. Dabei dient die Steigerung der DNTP-Bildung durch Rifampicin, charakterisiert durch den Quotienten der DNTP-Syntheseraten in An- und Abwesenheit des Antibiotikums, im linearen Teil der doppelt logarithmischen Abhängigkeit als eine direktes Maß für die Summe der Konzentrationen dieser beiden Ribonucleosidtriphosphate (Fig. IV).

Diese Methode ist dadurch ausgezeichnet, daß einerseits die Meßdaten sehr einfach zu bestimmen sind, andererseits aber Ribonucleosidtriphosphatkonzentrationen bis in den nanomolaren Bereich erfaßt werden. Prinzipiell kann

dieses Verfahren durch Erstellen neuer Eichkurven auch auf die Konzentrationsbestimmung einzelner Nucleosidtriphosphate ausgeweitet werden, da ja

Tab. I Charakterisierung der Reinheit von ATP und UTP nach den verschiedenen Stufen des Reinigungsverfahrens

Analog den Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1b) wurde die DNTP-Syntheserate jeweils in An- und Abwesenheit von 2 µg/ml Rifampicin mit solchen Substratlösungen bestimmt, die neben den Standardsalzkonzentrationen entweder käufliches, durch Chromatographie an Dowex AG 1x8 (Cl^-) (vgl. Methoden, Kap. 2a) oder zusätzlich durch Chromatographie an PEI-Cellulose (vgl. Methoden, Kap. 2b) gereinigtes ATP und [^{14}C]UTP enthielten. Aus der jeweiligen Steigerung der DNTP-Syntheserate durch Rifampicin wurde mit Hilfe von Fig. IV die jeweilige Konzentration an verunreinigendem GTP und CTP bestimmt.

Reinigungsschritt	Steigerung der DNTP-Synthese an T4 DNA durch Rifampicin	Konzentration an verunreinigendem GTP und CTP (mol/l)
käuflich erhältliches ATP und UTP	2,96	$1{,}05 \times 10^{-7}$
Dowex-gereinigtes ATP und UTP	1,75	$5{,}4 \times 10^{-8}$
PEI-Cellulose-gereinigtes ATP und UTP	1,23	$< 5 \times 10^{-8}$

schon die Bildung eines Trinucleosidpentaphosphat-Moleküls zu einer Verminderung der DNTP-Synthese führen sollte.

Rhodes und Chamberlin (1974) beschreiben eine ähnliche Methode zur Bestimmung von Nucleosidtriphosphaten. Diese beruht auf der kompetitiven Hemmung der RNA-Synthese an synthetischen Matrizen wie poly d(A-T) durch nicht als

Substrat dienende Nucleosidtriphosphate wie GTP und CTP. Gegenüber der oben beschriebenen Methode ist diese Bestimmung jedoch mit dem Nachteil behaftet, daß die Ermittlung vieler kinetischer Konstanten notwendig ist.

Da nun das Ausmaß der Steigerung der DNTP - Synthese an T4 DNA durch Rifampicin ein direktes Maß für die Summe der Konzentrationen der beiden Ribonucleosidtriphosphate GTP und CTP darstellt, konnte das Ausmaß der Reinigung von ATP und UTP an Hand der jeweiligen Steigerung der DNTP - Synthese durch Rifampicin verfolgt werden (Tab. I). Dabei kann mit Hilfe des liearen Bereichs der Eichkurve (Fig. IV) aus dem Ausmaß der Steigerung der DNTP - Synthese bis zu einer Konzentration von $5x10^{-8}$ mol/l GTP und CTP direkt die Konzentration an verunreinigendem GTP und CTP bestimmt werden.

Aus Tab. I geht hervor, daß sowohl der Reinigungsschritt der Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex AG 1x8 (Cl^-) als auch der Adsorptions-Chromatographie an PEI-Cellulose die Reinheit der Ribonucleosidtriphosphate ATP und UTP noch stark erhöhen. So wird die Konzentration an verunreinigendem GTP und CTP von $1,05x10^{-7}$ mol/l auf einen Wert kleiner als $5x10^{-8}$ mol/l reduziert.

3. Isolierung des ternären Transkriptionskomplexes

3a. Synthese des ternären Transkriptionskomplexes

Nach der Bildung des binären Enzym-DNA-Komplexes aus 6 µg RNA Polymerase Holenzym und 49,5 µg T7 D111 DNA durch Inkubation für 10 min bei 25°C in 150 µl einer Lösung, die 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C, 0,5 mmol/l DTE, 1,75 mmol/l $MgCl_2$ und 50 mmol/l KCl enthielt, wurde die Synthese von RNA durch Zugabe von 150 µl einer auf 25°C thermostatisierten Substratlösung, die 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C, 0,5 mmol/l DTE, 16 mmol/l $MgCl_2$, 50 mmol/l KCl, 100 mmol/l ATP, 50 mmol/l GTP, 50 mmol/l CTP und 50 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt, gestartet. Nach der weiteren Inkubation bei 25°C für 2 min erfolgte die Beendigung der Bildung des ternären Komplexes durch Abkühlung auf 0°C.

3b. Isolierung des ternären Transkriptionskomplexes

Analog der Vorschrift von Rohrer und Zillig (1977) wurden 300 µl Reaktionslösung bei 4°C auf eine Sepharose 4B Chromatographiesäule (1x15 cm; V=12 cm^3) aufgetragen, die vorher mit dem zehnfachen Säulenvolumen einer Lösung aus 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C, 5 mmol/l 2-Mercaptoäthanol, 10 mmol/l $MgCl_2$

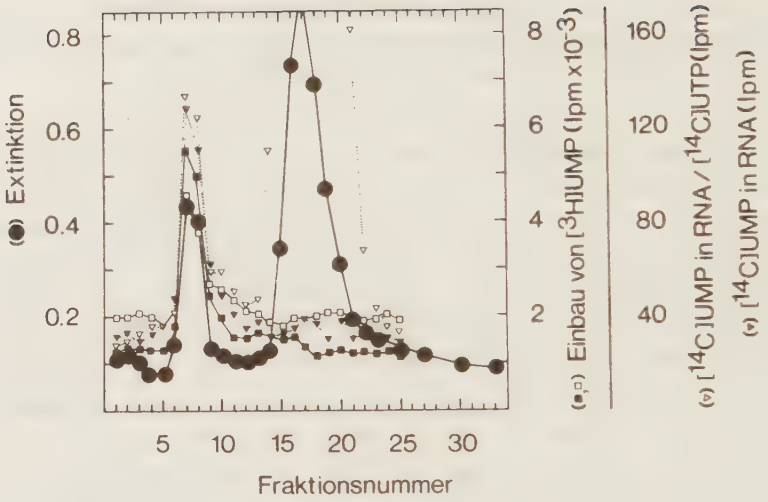


Fig. V Abtrennung des ternären Transkriptionskomplexes durch Gelchromatographie an Sepharose 4B

300 µl Reaktionslösung (vgl. Methoden, Kap. 3a) wurden bei 4°C auf eine Sepharose 4B Chromatographiesäule (1x15 cm), äquilibriert mit 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,9/25°C, 5 mmol/l Mercaptoäthanol, 10 mmol/l $MgCl_2$ und 50 mmol/l KCl, aufgetragen und chromatographiert.

(●—●) Absorption bei λ = 260 nm

(▽·····▽) Radioaktivität der Summe von [^{14}C]UTP und [^{14}C]UMP in der RNA des isolierten Transkriptionskomplexes

(▼·····▼) [^{14}C]UMP in der RNA des isolierten Transkriptionskomplexes

(□—□) Einbau von [^{3}H]UMP

(■—■) Einbau von [^{3}H]UMP in Anwesenheit von zusätzlich zugegebener T4 DNA

und 50 mmol/l KCl äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit dem Äquilibrierungspuffer in der Weise, daß das Eluat in 0,8 ml-Fraktionen aufgefangen wurde. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 0,3 ml/min. Fig. V zeigt ein typisches Elutionsprofil des Eluats.

Der Verlauf der Absorption bei λ = 260 nm zeigt zwei deutlich getrennte,

nucleotidhaltige Gipfel zwischen Fraktion 5 und 9 bzw. 14 und 22, die auf Grund der ebenfalls auftretenden Radioaktivität dem ternären Komplex aus Enzym, DNA und gebildeter [^{14}C]UMP-markierter RNA und den freien, nicht umgesetzten Ribonucleosidtriphosphaten zuzuordnen sind. Dabei weist schon die Reihenfolge der Elution und die unterschiedliche Größe der Gipfel darauf hin, daß der ternäre Komplex im ersten Gipfel lokalisiert ist.

Die exakte Unterscheidung zwischen den beiden Spezies erfolgte einerseits durch Chromatographie der einzelnen Fraktionen an Whatman 3MM Chromatographiepapier in dem schon beschriebenen WASP-Fließmittel (vgl. Methoden, Kap. 1a und 1b), da bei dieser Chromatographie nur polymeres Material, nicht aber Ribonucleosidtriphosphate an der Auftragstelle zurückbleiben. Auch sind nur die Fraktionen des ersten Gipfels befähigt, weiterhin den Einbau von [^{3}H]UMP in polymere Ribonucleotide zu katalysieren. Freies Enzym ist in den Fraktionen des ersten Gipfels nur wenig vorhanden, da das Hinzufügen von weiterer T4 DNA nach dem Isolationsvorgang keine Steigerung, sondern sogar eine geringe Reduktion des nachfolgenden Einbaus von [^{3}H]UMP in polymere Ribonucleotide zur Folge hat. Die leichte Stimulation der folgenden RNA-Synthese durch die nachträgliche Zugabe von T4 DNA zwischen Fraktion 9 und 14 läßt vermuten, daß in diesen Fraktionen die Elution von noch vorhandenem freien Enzym erfolgt.

Nach der Elution des ternären Komplexes wurden jeweils die Fraktionen des vorderen Gipfels vereinigt, und die optische Dichte der vereinigten Fraktionen bestimmt. Zur Untersuchung der Eigenschaften des isolierten ternären Transkriptionskomplexes wurden innerhalb der einzelnen Versuche (vgl. Ergebnisse, Kap. V.A.3) Lösungen gleicher optischer Dichte eingesetzt.

4. Dodecyl- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese in 5 %igen Polyacrylamidgelen, die 0,1 % Natrium-Dodecylsulfat enthielten, wurde nach der bei Shapiro et al. (1967) angegebenen und von Burgess (1969) modifizierten Vorschrift durchgeführt. Die Proteine wurden bei 37°C für 30 min in einem Puffer dissoziiert, der 10 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,2/25°C, 10 % Glycerin, 2 % 2-Mercaptoäthanol und 0.2 % Natrium-Dodecylsulfat enthielt. Die Elektrophorese erfolgte 2 h 45 min mit 30 V / 10 mA pro Gel bei Raumtemperatur. Danach wurden die Gele mit 0,05 % Cromassie Brilliant Blue G250, gelöst in Methanol:Eisessig:H_2O = 5:1:5, für

zwei Stunden gefärbt. Die elektrophoretische Entfärbung erfolgte in einer Lösung, die 7,5 % Essigsäure und 5 % Methanol enthielt. Die angefärbten Proteinzonen wurden mit einem Joyce Loebl Microdensitometer 3CS (Graukeil 1,94; Filter 5-040; Übersetzungsverhältnis zwischen Probe und Registrierschlitten: 1:3) densitometrisch ausgewertet.

5. Proteinbestimmung der Enzymlösungen

Die Proteinbestimmung wurde unter Zugrundelegung der Methode von Lowry et al. (1951) nach der Modifikation von Bensadoun und Weinstein (1976) durchgeführt, wobei als Eichprotein elektrophoretisch reines Rinderserum-Albumin verwendet wurde.

Die Konzentration von Sigma wurde durch quantitative densitometrische Auswertung des Dodecylsulfat-Polyacrylamidgels bestimmt.

Ergebnisse

I. RNA- und DNTP-Synthese als Parallelreaktionen

Inkubiert man RNA Polymerase aus Escherichia coli in Anwesenheit von Desoxyribonucleinsäure und Magnesium-Ionen mit den vier essentiellen Ribonucleosidtriphosphaten ATP, GTP, UTP und CTP, so läßt sich die Synthese langkettiger RNA beobachten (Hurwitz et al., 1960; Stevens, 1961).

Werden die Substrate jedoch auf ATP und UTP limitiert, so tritt der als "abortive initiation" bezeichnete Effekt der bevorzugten Bildung von Dinucleosidtetraphosphat (DNTP) auf. Die Synthese längerkettiger Oligoribonucleotide spielt unter diesen Bedingungen nur eine sehr geringe Rolle (Johnston und McClure, 1976)

Überraschend stellten diese Autoren weiter fest, daß die DNA-abhängige Katalyse der DNTP-Synthese sogar noch nach Vorinkubation der RNA Polymerase mit dem Antibiotikum Rifampicin ablaufen kann, während Oligo- und Polynucleotide in Anwesenheit des Hemmstoffs nicht mehr gebildet werden.

Es war deshalb von großem Interesse zu erfahren, in welchem Zusammenhang die Synthese von DNTP und langkettiger RNA steht, und welchen Einfluß Rifampicin auf das Ausmaß der Bildung dieser beiden verschiedenen Reaktionsprodukte der RNA Polymerase ausübt.

1. Einfluß der GTP- und CTP-Konzentration auf das Verhältnis der Synthese von RNA und DNTP

Um den Zusammenhang zwischen der Synthese von DNTP und langkettiger RNA zu studieren, wurden zunächst in Abwesenheit des Antibiotikums bei konstanten, optimalen ATP- und UTP-Konzentrationen die Konzentrationen von GTP und CTP

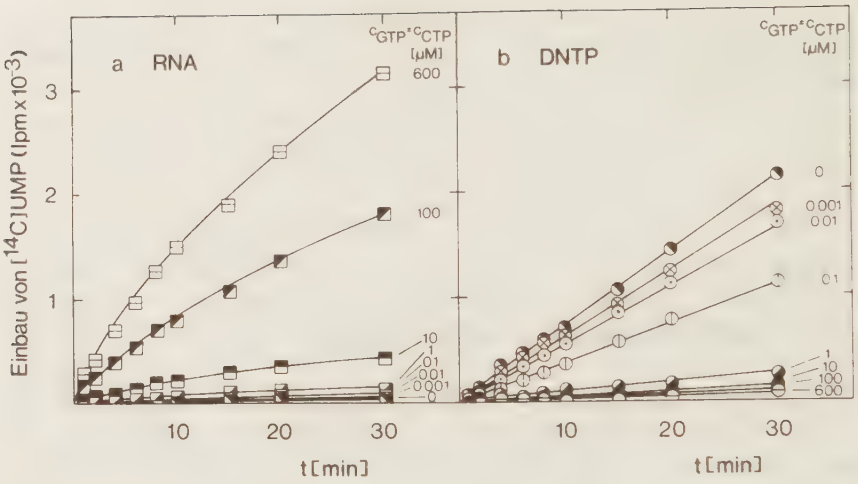


Fig. 1 Einfluß der GTP- und CTP-Konzentration auf die Bildung von RNA und DNTP

Zu je 5,1 µg RNA Polymerase Holoenzym wurde unter Standardbedingungen der RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) in der Salzmischung A jeweils 37,5 µg T4 DNA gegeben (result. Vol. je 125 µl). Diese Lösung wurde für 10 min bei 25°C inkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von je 125 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen 1,2 mmol/l ATP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) die beiden restlichen Ribonucleosidtriphosphate GTP und CTP in Konzentrationen zwischen 0 und 1,2 mmol/l enthielt, die der doppelten in der Abbildung angegebenen Konzentration entsprach. Nach der weiteren Inkubation bei 25°C wurde zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten jeweils 25 µl der Reaktionslösung entnommen, und der jeweilige Einbau von [^{14}C]UMP in RNA (Fig. 1a) und DNTP (Fig. 1b)bestimmt. Die jeweilige Konzentration von GTP und CTP betrug während der Reaktionsphase 0 mmol/l (◹,◔); 0,001 mmol/l (⊠,⊗); 0,01 mmol/l (⊡,⊙); 0,1 mmol/l (◫,◑); 1 mmol/l (◪,◒); 10 mmol/l (⬒,⬘); 100 mmol/l (◩,◐) und 600 mmol/l (⊟,⊖).

zwischen den beiden Extremen maximaler RNA- und DNTP-Synthese variiert.

Die Analyse der bei 25° an T4 DNA als Matrize gebildeten Reaktionsprodukte zeigt, daß bei allen untersuchten GTP- und CTP-Konzentrationen sowohl RNA als auch DNTP gebildet wird. Jedoch wird das Ausmaß der jeweiligen Synthese-

raten stark von der Konzentration der variierten Ribonucleosidtriphosphate bestimmt (Fig. 1).

Ist bei hohen GTP- und CTP-Konzentrationen die RNA-Synthese vorherrschend, so tritt bei kleinen Konzentrationen dieser Ribonucleosidtriphosphate die Bildung von DNTP immer mehr in den Vordergrund.

Verfolgt man den zeitlichen Verlauf der Bildung dieser beiden Katalyseprodukte, so zeigt sich, daß nur die Synthese von DNTP während der dreißigminutigen Inkubation mit konstanter Geschwindigkeit abläuft. Andere Experimente zeigen, daß die Syntheserate auch nach mehrstündiger Inkubationszeit nur wenig reduziert ist (vgl. Kessler, 1976). Im Gegensatz dazu wird die Geschwindigkeit der RNA-Bildung schon nach wenigen Minuten geringer, da an T4 DNA bei niedriger Ionenstärke keine Reinitiation langkettiger RNA erfolgen kann (Fuchs et al., 1967; Maitra et al., 1970; Richardson, 1970) [1].

Um einen quantitativen Zusammenhang zwischen der RNA- und DNTP-Synthese herstellen zu können, wurden die Anfangssyntheseraten dieser beiden Reaktionen gegen die GTP- und CTP-Konzentration betrachtet (Fig. 2).

Die Analyse der Bildung langkettiger RNA ergibt, daß deren Syntheserate bei der Verminderung der GTP- und CTP-Konzentration bis 1 µmol/l sehr stark abnimmt. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen anderer Autoren (Anthony et al., 1966). Bei weiterer Erniedrigung bleibt die Syntheserate jedoch relativ konstant und nimmt einen noch gut meßbaren Wert von 2-3 % der maximalen RNA-Syntheserate an.

Da die RNA-Synthese sowohl an T4 DNA als auch an T7 DNA vorherrschend mit ATP initiiert wird (Maitra et al., 1970), ist der beobachtete starke Abfall im wesentlichen auf eine Reduktion der Elongationsgeschwindigkeit zurückzuführen. Dies bestätigen die Untersuchungen von Rhodes und Chamberlin (1975),

---

[1] Die konstante Bildungsrate der DNTP-Synthese zeigt, daß die Abdissoziation des Reaktionsprodukts bei niedrigen Salzkonzentrationen kontinuierlich erfolgen kann. Im Gegensatz dazu ist bei der Termination der RNA-Synthese an T4 DNA nicht geklärt, ob die RNA-Kette auch schon bei niedriger Ionenstärke vom Enzym-DNA-Komplex abdissoziiert (vgl. Bremer und Konrad, 1964; Maitra und Barash, 1969; Millette und Trotter, 1970; Schäfer und Zillig, 1973).

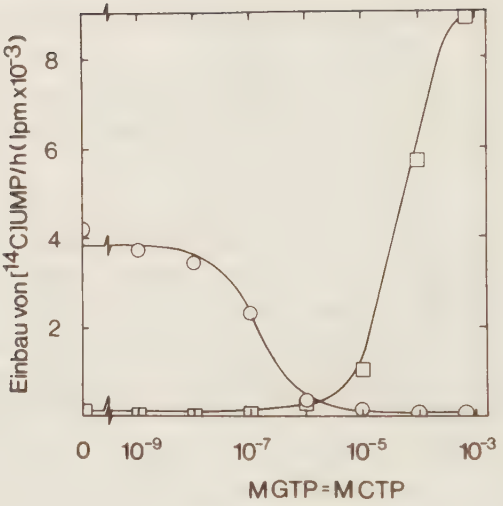


Fig. 2 Abhängigkeit der RNA- und DNTP-Syntheserate von der GTP- und CTP-Konzentration

Aus dem bei den verschiedenen GTP- und CTP-Konzentrationen beobachteten und in Fig. 1 wiedergegebenen zeitlichen Verlauf des Einbaus von [^{14}C]UMP in RNA und DNTP zu Beginn der Reaktion wurde die als Syntheserate/h angegebene RNA (□)- und DNTP (○)-Reaktionsgeschwindigkeit berechnet und als Funktion der Konzentration von GTP und CTP aufgetragen.

da an T7 DNA als Matrize die Initiationsrate der RNA-Synthese durch Reduktion der GTP- und CTP-Konzentration bis mindestens 1 µmol/l nicht beeinflußt wird. Einen weiteren Hinweis darauf, daß in diesem Konzentrationsbereich die Geschwindigkeit der Elongationsreaktion stark vermindert ist, gibt auch die Beobachtung, daß die RNA-Synthese bei kleinen Substratkonzentrationen diskontinuierlich abläuft (Darlix und Fromageot, 1972; Maizels, 1973; Gilbert et al., 1974).

Die Bildung von DNTP wird nun durch die Konzentration an GTP und CTP genau entgegengesetzt beeinflußt. Die optimale Einbaugeschwindigkeit von radioaktivem UMP in DNTP, die etwa 45 % der maximalen Einbaugeschwindigkeit die-

ses Nucleotids in langkettige RNA beträgt, wird in Abwesenheit der für die Elongation von RNA-Ketten essentiellen Ribonucleosidtriphosphate GTP und CTP erreicht [2]. Erhöht man die Konzentration dieser Ribonucleosidtriphosphate, so fällt die DNTP-Syntheserate zwischen 0,01 und 1 µmol/l stark ab und beträgt oberhalb 10 µmol/l noch etwa 1 % der maximal gebildeten RNA. Selbst bei 600 µmol/l ist die zwar geringe, doch sicher erkennbare, stetige Bildung von DNTP zu beobachten. Johnston und McClure (1976) fanden ebenfalls, daß E. coli RNA Polymerase unter optimalen Synthesebedingungen sowohl an λb2 DNA mit allen vier Ribonucleosidtriphosphaten als auch an poly d(A-T) in Gegenwart von ATP und UTP nicht nur langkettige RNA, sondern auch in geringem Umfang die Bildung von DNTP katalysiert. Bei der RNA-Bildung durch RNA Polymerase aus Micrococcus luteus an T4 DNA wurde gleichfalls bei hohen Konzentrationen aller vier Ribonucleosidtriphosphate neben der Synthese von Polyribonucleotiden diese geringe DNTP-Bildung festgestellt (S. Lechner, Dissertation).

Der Vergleich mit der RNA-Synthese zeigt, daß DNTP nur unter solchen Bedingungen optimal gebildet wird, bei denen die Elongationsgeschwindigkeit der Bildung langkettiger RNA sehr stark reduziert ist. Umgekehrt wird DNTP unter Bedingungen maximaler RNA-Synthese nur noch zu einem sehr geringen Prozentsatz gebildet.

RNA-Synthese und "abortive initiation" sind also Reaktionen, die zwar grundsätzlich nebeneinander ablaufen können, deren jeweiliges Ausmaß jedoch nicht unabhängig voneinander ist, sondern entgegengesetzt von der Konzentration der für die Elongation langer RNA-Ketten essentiellen Ribonucleosidtriphosphate GTP und CTP beeinflußt wird.

---

[2] Der unmittelbare Vergleich der mittleren RNA- und DNTP-Syntheseraten ist auf Grund des unterschiedlichen relativen Einbaus von UMP in die beiden Molekülarten nicht möglich. Zwar ließe sich über den Adeningehalt der DNA des Phagen T4 von 32,2 % (Wyatt und Cohen, 1953) die mittlere Syntheserate der RNA-Bildung bestimmen. Jedoch ist es nicht möglich, aus der pppApU-Bildung die mittlere DNTP-Synthsesrate exakt zu berechnen, da die mögliche Bildung von Dinucleotiden anderer Zusammensetzung nicht erfaßt wurde. Da aber an T4 DNA die in vitro synthetisierte RNA vorherrschend mit pppApU beginnt (Bautz et al., 1970; Downey et al., 1971), ist zu erwarten, daß an dieser Matrize pppApU als Hauptprodukt der DNTP-Bildung auftritt und somit ein geeignetes Maß für die insgesamt ablaufende Synthese von DNTP darstellt.

Nun ist schon lange bekannt, daß es selbst unter optimalen Bedingungen der RNA-Synthese Enzym-DNA-Komplexe geben muß, bei denen schon nach wenigen Kondensationsschritten die Bildung von RNA abbricht, und die daher als "early quitters" bezeichnet wurden (Müller und Bremer, 1969). Das Auftreten von DNTP selbst bei hohen Konzentrationen aller vier Ribonucleosidtriphosphate deutet stark darauf hin, daß dieser Abbruch der RNA-Synthese schon nach dem ersten Kondensationsschritt auftreten kann und mit zunehmender Limitierung der für die Elongation essentiellen Ribonucleosidtriphosphate GTP und CTP in immer größerem Umfang den Reaktionsablauf beeinflußt.

2. Einfluß von Rifampicin auf die RNA- und DNTP-Synthese

Im folgenden Experiment wurde der Einfluß von Rifampicin auf das relative Verhältnis der RNA- und DNTP-Synthese an T4 DNA studiert. Dabei wurde wiederum die GTP- und CTP-Konzentration zwischen den beiden Extremen maximaler RNA- und DNTP-Synthese, diesmal jedoch in Anwesenheit von Rifampicin, variiert (Fig. 3).

Um einem Schutz der DNA gegenüber dem Angriff des Antibiotikums vorzubeugen (Temple und Rhodes, in Vorbereitung) und alle Enzymmoleküle mit dem Antibiotikum abzusättigen, wurde jeweils die freie RNA Polymerase mit Rifampicin 10 min bei 25°C vorinkubiert. Unter diesen Bedingungen werden alle Enzymmoleküle in weniger als 6 sec vollständig in Hinblick auf die RNA-Synthese inaktiviert (Kerrich, 1973). Nach der weiteren Inkubation mit T4 DNA, ebenfalls 10 min bei 25°C, wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrats gestartet.

Wertet man die Syntheseraten wie im vorhergehenden Experiment quantitativ aus, so fällt sofort auf, daß diesmal die Bildung von DNTP als nahezu einziges radioaktiv markiertes Reaktionsprodukt nicht nur bei niedrigen, sondern auch bei sehr hohen GTP- und CTP-Konzentrationen beobachtet werden kann. Unabhängig von der Konzentration dieser beiden Ribonucleosidtriphosphate beträgt die Einbaugeschwindigkeit von radioaktivem UMP in DNTP etwa 65 % der im rifampicinfreien System maximalen Einbaugeschwindigkeit dieses Nucleotids in lange RNA-Ketten (vgl. Fig. 2). Lediglich bei sehr hohen Konzentrationen läuft die DNTP-Bildung etwas langsamer ab. Diese Reduktion wird wahrscheinlich dadurch verursacht, daß durch die Anlagerung des dritten Nucleotids der ternäre Enzym-DNA-Produkt-Komplex stabilisiert wird (vgl. Ergeb-

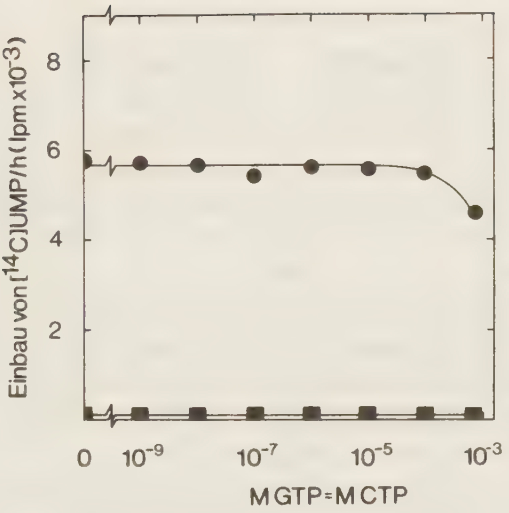


Fig. 3 Abhängigkeit der RNA- und DNTP-Syntheserate von der GTP- und CTP-Konzentration in Anwesenheit von Rifampicin

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen von Fig. 1 mit Ausnahme der Änderung identisch, daß das freie Enzym in der Standardsalzmischung A jeweils vor der Zugabe der T4 DNA zusätzlich in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert wurde. Die Bestimmung ung Auftragung der RNA (■)- und DNTP (●)-Syntheseraten aus dem bei den verschiedenen GTP- und CTP-Konzentrationen in Anwesenheit von Rifampicin jeweils beobachteten Einbau von [^{14}C]UMP in RNA und DNTP erfolgte wie in Fig. 2.

nisse, Kap. IV).

Im Gegensatz dazu wird über den gesamten Konzentrationsbereich die Synthese langkettiger RNA fast vollständig verhindert. Die nur verschwindend geringe, jedoch noch sicher meßbare RNA-Bildung beträgt etwa 1 % der in Abwesenheit des Antibiotikums beobachtbaren RNA-Synthese. Diese äußerst geringe RNA-Restsynthese durch E. coli RNA Polymerase wurde ebenso von anderen Autoren beobachtet, jedoch konnte deren Ursache nicht vollständig geklärt werden (Temple und Rhodes, in Vorbereitung). Auch bei RNA Polymerase aus Micrococcus luteus ist neben der kontinuierlichen DNTP-Bildung die ebenfalls geringe

RNA-Bildung durch den Rifampicin-Enzym-DNA-Komplex deutlich sichtbar (S. Lechner, Dissertiation).

Analysiert man die Synthese des an T4 DNA nur durch einen Elongationsschritt gebildeten Trinucleosidpentaphosphats, so ergibt sich, daß in Anwesenheit von Rifampicin bei allen GTP- und CTP-Konzentrationen auch schon die Bildung dieses kurzen RNA-Produkts nicht mehr katalysiert werden kann (ohne Beleg). Dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen von Johnston und McClure (1976) an λb2 DNA als Matrize überein.

Studien von McClure und Cech (1978) an Hae III-Fragmenten von λb2-DNA zeigen ebenfalls, daß in Anwesenheit des Antibiotikums schon Trinucleosidpentaphosphat nicht mehr gebildet werden kann. Lediglich am $\lambda P_{R'}$-Promotor schien diese Regel durchbrochen zu sein, jedoch konnte das an diesem Promotor gebildete Produkt nicht eindeutig identifiziert werden.

Rifampicin erzwingt also den unter normalen Synthesebedingungen nur in geringen Ausmaß beschrittenen Reaktionsweg der "abortiven initiation" dadurch, daß es den parallelen Reaktionsweg der RNA-Synthese fast vollständig blokkiert, so daß selbst die Bildung von Trinucleosidtetraphosphat nicht mehr möglich ist. Dadurch wird bei allen GTP- und CTP-Konzentrationen Dinucleosidtetraphosphat als vorherrschendes Reaktionsprodukt gebildet.

3. Konzentrationsabhängigkeit der Rifampicinwirkung

Die Blockierung der Synthese langkettiger RNA ist ein spezifischer Effekt von Rifampicin und tritt daher schon bei kleinen Konzentrationen des Hemmstoffs auf (Hartmann et al., 1967). Falls es richtig ist, daß die Steigerung der Syntheserate von DNTP in Anwesenheit des Antibiotikums auf die spezifische Blockierung der parallelen RNA-Synthese zurückzuführen ist, sollte bei Erhöhung der Rifampicinkonzentration die zunehmende Reduktion der RNA-Synthese mit dem gleichzeitigen Anstieg der DNTP-Bildung verbunden sein. Dies bedeutet aber, daß die Steigerung der DNTP-Synthese im Gegensatz zu anderen molekularen Reaktionen des Hemmstoffs (vgl. Wehrli, 1977 [3]))

---

[3]) So wird die Hemmung einer großen Zahl von DNA und RNA Polymerasen bakteriellen, eukariotischen und viralen Ursprungs durch Rifampicinderivate mit lipophilen Seitenketten beschrieben. Daraus erklärt sich wohl auch die in-

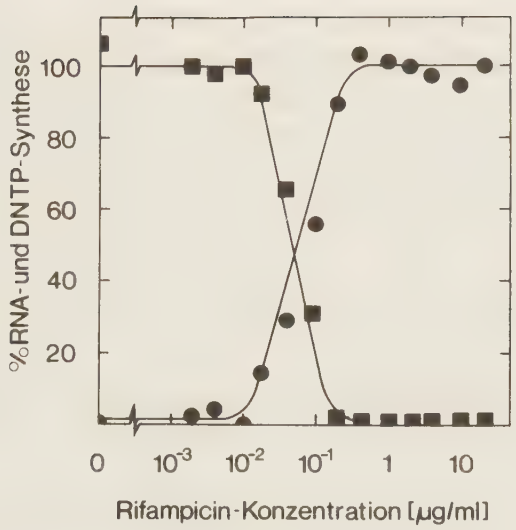


Fig. 4 Dosis-Wirkungs-Kurve des Rifampicins

Je 2 µg RNA Polymerase Holoenzym wurden unter Standardbedingungen der RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) in jeweils 40 µl Vorinkubationslösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen zusätzlich die auf der Abszisse aufgetragenen Konzentrationen an Rifampicin enthielten, für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von je 60 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen 14,1 µg T4 DNA, je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (1 µCi/µmol) enthielt. Die jeweilige Enzymaktivität wurde durch den Einbau von [^{14}C]UMP in die Reaktionsprodukte bei 25°C bestimmt. Dabei wurde aus dem Einbau von [^{14}C]UMP in RNA während der ersten 15 min und in DNTP während 30 min die jeweilige Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt und nach Umrechnung in die Syntheserate/h prozentual gegen die Rifampicinkonzentration während der Vorinkubation aufgetragen.
100 % der RNA-Synthese (■) bei 0 µg/ml Rifampicin: 2380 Ipm/h
100 % der DNTP-Synthese (●) bei 2 µg/ml Rifampicin: 1830 Ipm/h

---

hibierende Wirkung lipophiler Rifampicinderivate auf das Wachstum von DNA Viren und RNA Tumorviren. Diese Wirkungen des Antibiotikums treten jedoch nur bei Konzentrationen größer als 1 µg/ml auf und spiegeln somit nur unspezifische Reaktionen wahrscheinlich der lipophilen Seitenkette des Antibiotikums wider (Riva et al., 1972).

ebenfalls eine spezifische Wirkung des Antibiotikums darstellen sollte.

Inkubiert man RNA Polymerase mit steigenden Rifampicinkonzentrationen, so stellt man fest, daß die anschließende Transkription der T4 DNA in Ribonucleinsäure bei Konzentrationen kleiner 0,01 µg/ml unbeeinflußt abläuft (Fig. 4). Jedoch wird die Katalyse der RNA-Bildung im Bereich zwischen 0,01 und 0,2 µg/ml zunehmend inhibiert. Halbmaximale Hemmung tritt bei einer Konzentration von 0,06 µg/ml Rifampicin auf. Bei Konzentrationen größer als 0,2 µg/ml ist die Bildung von Polyribonucleotiden nur noch zu dem schon erwähnten äußerst geringen Prozentsatz nachzuweisen (vgl. Ergebnisse, Kap. I.2). Dieser Befund steht in Einklang mit den Ergebnissen, die schon von Hartmann et al. (1967) beschrieben wurden. Die geringen Unterschiede zwischen der in Fig. 4 und von Hartmann et al. (1967) bestimmten halbmaximalen Hemmung sind wohl auf die Verwendung verschiedener Enzymkonzentrationen zurückzuführen.

Betrachtet man nun in Gegenwart der vier Ribonucleosidtriphosphate die Abhängigkeit der Katalyse von DNTP, so stellt man einen genau entgegengesetzten Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve fest. Während bei kleinen Rifampicinkonzentrationen Dinucleosidtetraphosphat nur in äußerst geringem Umfang synthetisiert wird, steigt dessen Bildung zwischen 0,01 und 0,2 µg/ml direkt proportional zur Inhibierung der RNA-Synthese an. Oberhalb 0,2 µg/ml wird die Bildung von DNTP mit einer konstanten, optimalen Geschwindigkeit katalysiert. Diese reziproke Proportionalität hat zur Folge, daß auch die halbmaximale Steigerung der DNTP-Synthese wiederum bei 0,06 µg/ml auftritt. Die Steigerung der DNTP-Synthese stellt somit ebenfalls eine spezifische Wirkung von Rifampicin dar.

Der exakt spiegelbildliche Verlauf der beiden Konzentrationsabhängigkeiten zeigt wiederum deutlich, daß an die zunehmende Blockierung der RNA-Synthese unmittelbar die kontinuierliche Steigerung der DNTP-Bildung gekoppelt ist. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß Rifampicin die Steigerung der DNTP-Syntheserate unmittelbar durch die spezifische Blockierung der Katalyse langkettiger RNA erzwingt.

4. Ausmaß der Steigerung der DNTP-Synthese durch Rifampicin

Der Vergleich der DNTP-Syntheseraten in Ab- und Anwesenheit des Hemmstoffs (vgl. Fig. 2 und 3) zeigt, daß die Bildung von DNTP im rifampicinfreien Sy-

stem sehr stark von der Konzentration der Nucleosidtriphosphate GTP und CTP abhängt (Fig. 2). Im Gegensatz dazu läuft die Synthese dieses Produkts in Anwesenheit des Antibiotikums nahezu konzentrationsunabhängig ab (Fig. 3). Die prozentuale Steigerung der DNTP-Bildung beim Übergang vom hemmstoffreien zum hemmstoffhaltigen System (Kessler und Hartmann, 1977) hängt deshalb ganz entscheidend von der als Vergleich dienenden DNTP-Syntheserate im rifampicinfreien System ab und wird daher in gleicher Weise von der GTP- und CTP-Konzentration beeinflußt [4].

Wie der Vergleich der beiden Abhängigkeiten der DNTP-Bildung in Fig. 2 und 3 zeigt, bewirkt Rifampicin nicht nur bei hohen, sondern auch bei sehr niedrigen Konzentrationen dieser beiden Ribonucleosidtriphosphate eine Steigerung der DNTP-Syntheserate. Selbst bei Ansätzen ohne Zusatz von GTP und CTP beträgt die Steigerung noch etwa 20 %.

Die Beobachtung, daß das Antibiotikum bei 25°C die DNTP-Synthese in Gegenwart von ATP und UTP nicht inhibiert, sondern stimuliert, wurde schon früher beschrieben (Kessler und Hartmann, 1977) und auch von anderen Autoren bestätigt (McClure und Cech, 1978).

Da aber bei der Inkubation des Enzym-DNA-Komplexes mit gereinigtem ATP und UTP ohne Zusatz von GTP und CTP die Bildung von RNA nicht möglich sein sollte, stellte sich die Frage, ob die Steigerung der DNTP-Syntheserate durch Rifampicin auch unter diesen Bedingungen auf die Blockierung einer minimalen RNA-Restsynthese zurückzuführen ist (vgl. Anm. 5), oder ob der Wirkstoff die Bildung von DNTP noch zusätzlich durch eine direkte Erhöhung der DNTP-Bildungsgeschwindigkeit stimuliert.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde der Einfluß des Antibiotikums auf die Bildung von DNTP unter solchen Bedingungen untersucht, bei denen die Entstehung langer RNA-Ketten weitgehend ausgeschlossen ist.

Um eine mögliche RNA-Bildung zu verhindern, wurde in einem ersten Experiment ATP durch α,β-Methylen ATP ersetzt. Dieses ATP-Analogon verhindert die Elon-

---

[4] Dieser Zusammenhang bietet eine Möglichkeit, die Konzentration von GTP und CTP auf eine neue Weise zu bestimmen (vgl. Methoden, Kap. 2c).

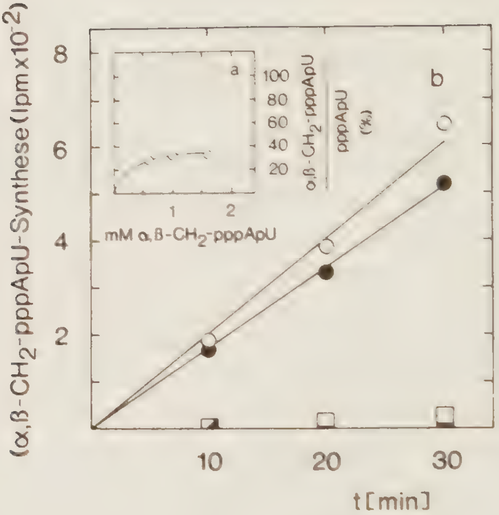


Fig. 5 Einfluß von Rifampicin auf die DNTP-Synthese mit α,β-Methylen-ATP und UTP als Substrat

a. Bestimmung der optimalen α,β-Methylen-ATP-Konzentration

Zur Festlegung der für die Bildung von α,β-Methylen-pppApU optimalen α,β-Methylen-Konzentration wurde das jeweilige Ausmaß der Syntheserate des DNTP-Analogons unter den Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, 3b) mit der Veränderung bestimmt, daß die verschiedenen Substratlösungen an Stelle von 1,2 mmol/l ATP die doppelte der auf der Abszisse angegebenen Konzentration an α,β-Methylen-ATP enthielten. Als Bezugswert diente die pppApU-Synthese mit 0,6 mmol/l ATP und 0,8 mmol/l [^{3}H]UTP (2 µCi/µmol) als Substrat (100 % = 3600 Ipm/h).

b. Einfluß von Rifampicin auf die Bildung von α,β-Methylen-pppApU

In zwei parallelen Ansätzen wurde unter Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 3b) jeweils 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym in der Salzmischung A in An- oder Abwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde je 15,2 µg T4 DNA zugegeben (Gesamt. Vol.: je 50 µl), und die Inkubation für weitere 10 min bei 25°C fortgesetzt. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte durch Zugabe von 50 µl einer bei 25°C thermostatisierten Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen 1,2 mmol/l α,β-Methylen-ATP und 0,8 mmol/l [^{3}H]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Nach der weiteren Inkubation bei 25°C wurde zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten je [illegible] µl entnommen und das Ausmaß der RNA- und DNTP-Synthese in An (■,●)- und Abwesenheit (□,○) von Rifampicin bestimmt.

gation von RNA-Ketten, da auf Grund der Stabilität der Kohlenstoff-Phosphor-Bindung die Kondensation des ATP-Analogons mit der 3'-OH-Ende der wachsenden Ribonucleinsäure nicht mehr stattfinden kann. So findet man auch bei der Inkubation des Enzym-DNA-Komplexes mit α,β-Methylen-ATP, GTP, CTP und UTP weniger als 1 % derjenigen RNA-Synthese, die bei der Verwendung von ATP an Stelle des Analogons auftritt (ohne Beleg). Der Vorgang der Initiation sollte jedoch nicht verhindert sein, da beim initiierenden Nucleosidtriphosphat kein Pyrophosphorat abgespalten wird (Maitra und Hurwitz, 1965).

Tatsächlich läßt sich bei der Inkubation des Enzym-DNA-Komplexes mit α,β-Methylen-ATP und UTP die stetige Synthese von α,β-Methylen-ppApU beobachten. Die Syntheserate, bezogen auf die Bildungsgeschwindigkeit mit ATP und UTP als Substrat, beträgt bei 0,6 mmol/l α,β-Methylen-ATP und UTP als Substrat etwa 30 % (Fig. 5a). Da eine Konzentrationssteigerung von α,β-Methylen ATP auf 1,5 mmol/l keine nennenswerte Erhöhung der Syntheserate bewirkt, wurde der Einfluß von Rifampicin auf die Bildung dieses modifizierter Dinucleosidtetraphosphats bei der Konzentration von 0,6 mmol/l α,β-Methylen-ATP untersucht.
Der Vergleich der Bildungsraten zeigt, daß das Antibiotikum die Synthese von α,β-Methylen-ppApU unter diesen Bedingungen nicht mehr stimuliert, sondern im Gegenteil sogar um etwa 10 % inhibiert (Fig. 5b).

In einem weiteren Experiment wurde die Reduktion der DNTP-Bildung durch eine parallel ablaufende minimale RNA-Bildung dadurch verhindert, daß im Inkubationsansatz eventuell noch vorhandene Spuren von GTP und CTP vor der Bestimmung des Einflusses von Rifampicin auf die Geschwindigkeit der DNTP-Bildung durch die enzymatisch katalysierte Bildung von unmarkierter RNA beseitigt wurden (Fig. 6).

Dazu wurden in zwei identischen Parallelansätzen der Enzym-DNA-Komplex zusammen mit den unmarkierten Nucleosidtriphosphaten ATP und UTP über einen Zeitraum von 60 min bei 25°C inkubiert. Während dieser vorausgehenden Polymerisationsreaktion nimmt die Anzahl der DNTP-synthetisierenden Enzym-DNA-Komplexe ab, da ein Teil davon eventuell vorhandene Spuren von GTP und CTP zu RNA-Ketten einbaut. Diese Anzahl ist jedoch in beiden Inkubationsansätzen identisch, so daß die Konzentration der verbleibenden DNTP-synthetisierender Enzym-DNA-Komplexe gleich bleibt. Anschließend wurde zu einem der beiden Ansätze Rifampicin zugegeben, und die Inkubation für weitere 15 min

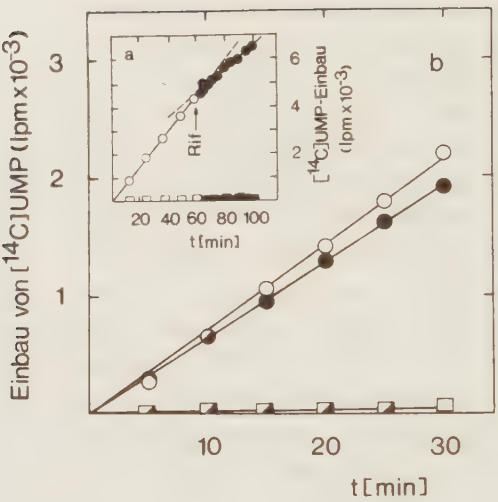


Fig. 6 Einfluß von Rifampicin auf die DNTP-Synthese nach der zusätzlichen Beseitigung von GTP und CTP aus der Testmischung durch die enzymatische Bildung von Polynucleotiden

a. Rifampicinzugabe zur laufenden DNTP-Synthese nach 60 min

Zu 10,2 µg RNA Polymerase Holoenzym wurde unter Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1b) in der Salzmischung A 30,0 µg T4 DNA gegeben (result. Vol. = 250 µl). Nach der Inkubation für 10 min bei 25 °C erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 250 µl einer bei 25°C thermostatisierten Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen 1,2 mmol/l ATP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Nach der weiteren Inkubation für 60 min bei 25°C wurden 5 µl 160 µg/ml Rifampicin-Lösung (= 0,8 µg) zugegeben und die Inkubation bei 25°C fortgesetzt. Zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurde je 25 µl Reaktionslösung entnommen, und der Einbau von [^{14}C]UMP in DNTP (○) und RNA (□) bestimmt.

b. Vergleich der DNTP-Syntheseraten in An- und Abwesenheit von Rifampicin nach der enzymatischen Reinigung der Substrate

In zwei parallelen Ansätzen wurde unter Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1b) jeweils zu 4,1 µg RNA Polymerase Holoenzym in der Salzmischung A 30,0 µg T4 DNA gegeben (result. Vol. je 100 µl).Nach der Inkubation für 10 min bei 25°C erfolgte der Start der Reaktion in beiden Ansätzen durch Zugabe von je 80 µl einer bei 25°C thermostatisierten Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen 1,5 mmol/l ATP und 1,0mmol/l [^{14}C]UTP enthielt. Danach wurde die Inkubation für 60 min fortgesetzt. Anschließend wurde einem der beiden Ansätze 10 µl einer Lösung, die 40 µg/ml Rifampicin enthielt, dem anderen 10 µl H_2O zugefügt, und die Inkubation für weite-

fortgesetzt. Dem parallelen Ansatz wurde die entsprechende Menge H_2O zugefügt. Innerhalb dieses Zeitraums desaktiviert der Hemmstoff etwa 99 % der Enzym-DNA-Komplexe (Temple und Rhodes, in Vorbereitung). Da die Anwesenheit von ATP und UTP die Anlagerung des Antibiotikums nicht grundsätzlich verhindert, sondern nur verzögert (Kessler und Hartmann, 1977; Ergebnisse, Kap. V.A.3, Fig. 35), hat sich der Hemmstoff während der Vorinkubation an den überwiegenden Teil der DNTP-synthetisierenden Enzymmoleküle gebunden. Dies zeigt auch die Tatsache, daß die Veränderung der DNTP-Syntheserate durch Rifampicin schon spätestens 10 min nach Zugabe des Hemmstoffs maximal ist (Fig. 6a). Da von der Rifampicinzugabe abgesehen beide Parallelansätze genau gleich behandelt wurden, spiegelt das Verhältnis der nachfolgenden DNTP-Synthese in An- und Abwesenheit von Rifampicin direkt den Einfluß des Antibiotikums auf die Bildungsgeschwindigkeit von Dinucleosidtetraphosphat wider. Daher wurde die anschließende DNTP-Bildung durch Zugabe von UTP hoher spezifischer Radioaktivität (50 µCi/µmol) verfolgt.

Der Vergleich der Bildungsraten zeigt, daß Rifampicin auch unter diesen Bedingungen die DNTP-Syntheserate nicht mehr stimuliert, sondern wiederum geringfügig um etwa 10 % inhibiert (Fig. 6b).

Somit zeigen beide Experimente, daß der Wirkstoff bei 25°C unter Bedingungen, die eine parallele RNA-Synthese weitgehend verhindern, die Syntheserate der DNTP-Bildung nur wenig beeinflußt. Daraus muß man schließen, daß Rifampicin bei 25°C die Geschwindigkeit der DNTP-Synthese selbst direkt nur wenig beeinflußt. Vielmehr muß die beobachtete Steigerung der DNTP-Syntheserate durch das Antibiotikum auch bei der Inkubation lediglich mit hochgereinigtem ATP und UTP als Substrat auf die spezifische Blockierung einer minimalen RNA-Restsynthese zurückgeführt werden und stellt somit nur eine indirekte Wirkung des Hemmstoffs dar [5].

---

re 15 min bei 25°C fortgeführt. Daraufhin wurde beiden Ansätzen je 10 µl einer 0,3 mmol/l enthaltenden [^{14}C]UTP-Lösung (40 µCi/µmol) zugesetzt, und die Inkubation bei 25°C weitergeführt. Zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurde jeweils 25 ul der Reaktionslösung entnommen, und das Ausmaß der RNA- und DNTP-Synthese in An (■,●)- und Abwesenheit (□,○) von Rifampicin durch den Einbau von [^{14}C]UMP in beide Produkte bestimmt.

5) Für die RNA-Restsynthese gibt es mehrere plausible Erklärungsmöglichkei-

Dieser Schluß wird auch dadurch bestätigt, daß die Abhängigkeit der Steigerung der DNTP-Synthese von der Rifampicin-Konzentration den gleichen spezifischen Verlauf wie die Hemmung der Bildung langkettiger RNA aufweist (ohne Beleg). Dies bedeutet aber, daß die beobachtete Steigerung der DNTP-Bildung

---

ten:

1. Die Reinigung der verwendeten Ribonucleosidtriphosphate ist nicht vollständig, so daß bei der Inkubation mit ATP und UTP noch eine geringe RNA-Synthese ablaufen kann.

2. Verwendet man verschiedene Enzym- oder DNA-Präparationen, so beobachtet man im rifampicinfreien System unterschiedliche DNTP-Syntheseraten, während die DNTP-Syntheseraten in Anwesenheit des Hemmstoffs sehr ähnlich sind. Dies weist darauf hin, daß in den Enzym- und DNA-Präparationen Ribonucleosidtriphosphate als Verunreinigungen enthalten sind.

3. E. coli RNA Polymerase katalysiert bei Inkubation mit nativer T2 DNA die Kondensation von ATP zu poly rA (Bass und Polonsky, 1974). Auch die de novo Synthese von poly rA:rU wurde beobachtet (Smith et al., 1967). Diese bekannten Reaktionen stellen eine Möglichkeit dar, auch in Abwesenheit von GTP und CTP Polyribonucleotide zu bilden. Die Daten in Tab. 1 zeigen, daß

Tab. 1 Ribopolynucleotid-Synthese an T4 DNA mit ATP oder UTP und de novo poly rA:rU -Synthese mit ATP und UTP als Substrat

Je 7,7 µg RNA Polymerase Holoenzym wurden unter Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden,Kap. B) in der Salzlösung A in Ab- oder Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde in die ersten beiden Ansätzt 14,1 µg T4 DNA, in den dritten das entsprechende Volumen H_2O zugegeben (result. Vol. je 50 µl). Nach der weiteren Inkubation für 10 min bei 25°C wurden die verschiedenen Reaktionen durch Zugabe von Substrat [illegible] µmol) oder 1,2 mmol/l [^{14}C]ATP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielten.

NTP	DNA	Ipm/h	
		-Rif	+Rif
ATP	T4	1933	228
UTP	T4	221	18
ATP+UTP	-	15	3

durch Rifampicin letztlich nur aus der Erhöhung der Zahl der Enzym-DNA-Komplexe resultiert, die die Synthese von DNTP katalysieren.

5. Einfluß der UTP- und ATP-Konzentration

Wie im vorausgehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, erzwingt Rifampicin die Steigerung der DNTP-Bildung nicht direkt durch die Erhöhung der Bildungsgeschwindigkeit, sondern im wesentlichen indirekt durch die spezifische Inhibierung der Synthese langkettiger RNA.

Dieser Zusammenhang zwischen RNA- und DNTP-Bildung wird durch diejenigen Er- [illegible] auf die Substratabhängigkeit der DNTP-Synthese erhalten wurden.

5a. UTP-Abhängigkeit

Betrachtet man zunächst den Einfluß der UTP-Konzentration auf das Ausmaß der

---

im vorgegebenen Testsystem tatsächlich bei der Inkubation mit ATP oder UTP die Synthese von poly rA und in kleinerem Ausmaß auch von poly rU auftreten kann. Da auch in Anwesenheit von markiertem ATP und unmarkiertem UTP noch Radioaktivität in polymerem Material auftritt (Chamberlin und Berg, 1962; 1964), ist die analoge DNA-abhängige Bildung von poly r(A-U) bei Inkubation mit ATP und UTP durchaus denkbar. Die fast vollständige Hemmbarkeit der poly rA-Synthese durch Rifampicin beweist, daß diese Synthese hauptsächlich durch RNA Polymerase und nicht durch ATP:RNA Adenyltransferase, die in der Enzympräparation eventuell als Verunreinigung enthalten ist, katalysiert wird (Sippel, 1973). Die *de novo* Synthese von poly rA:rU findet jedoch, wahrscheinlich wegen des Fehlens essentieller Mangan-Ionen, selbst nach sechsstündiger Inkubation nicht statt (Tab. 1). Dieses Ergebnis schließt auch die RNA Bildung durch in der Enzympräparation möglicherweise vorhandene Polynucleotid- [illegible] (McConnel und Bonner, 1972).

4. Anfangssequenzen der RNA-Transkripte, in die über die Bildung von DNTP hinaus nur AMP und UMP eingebaut werden, führen im rifampicinfreien System ebenfalls unabhängig von der An- oder Abwesenheit von GTP und CTP zu einer Erniedrigung der DNTP-Synthese. Da schon die Bildung eines Trinucleotids zu einem stabilen Elongationskomplex führt (Dausse *et al.*, 1975), steht dieser Komplex für die DNTP-Synthese nicht mehr zur Verfügung. Die Möglichkeit solch spezieller Anfangssequenzen muß auf Grund der großen Zahl von Genen, die von T4 DNA codiert werden, in Betracht gezogen werden (Edgar und Wood, 1966). Obwohl *E. coli* RNA Polymerase *in vitro* nur an "immidiate early"-Pro- [illegible] synthetisiert wird (Witmer, 1971), findet man bei der Auftrennung von *in vitro* Transkriptionsprodukten tatsächlich eine große Zahl verschiedener RNA-Spezies (Rüger, 1975; 1978).

DNTP-Synthese in Abwesenheit von Rifampicin, so sieht man, daß die DNTP-Bildung bei der Erhöhung der UTP-Konzentration auf etwa 0,07 mmol/l stark zunimmt (Fig. 7a). Oberhalb dieses Werts bewirkt die weitere Steigerung der

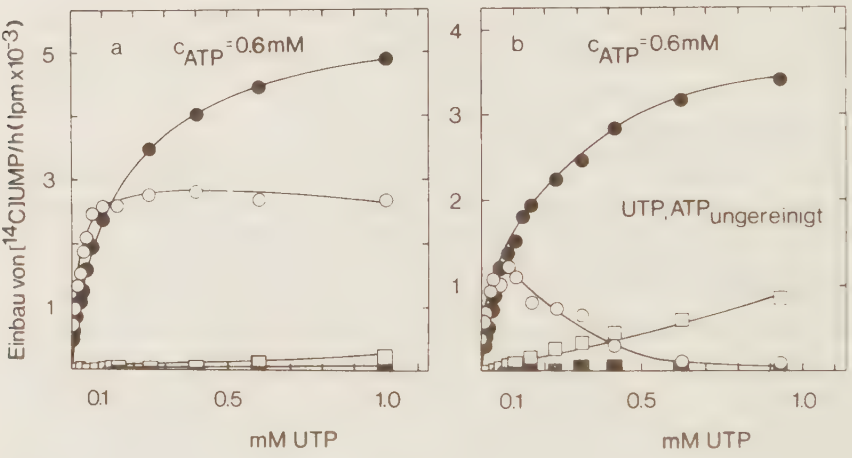


Fig. 7 Einfluß von Rifampicin auf die UTP-Abhängigkeit der DNTP-Synthese

a. Verwendung von doppelt gereinigtem ATP und UTP als Substrat (vgl. Methoden, Kap. 2a und 2b)

In zwei parallelen Testreihen wurden unter Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1b) jeweils 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym in der Salzmischung A in An- oder Abwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde je 14,1 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 50 µl), und die Inkubation für weitere 10 min bei 25°C fortgesetzt. Der Start der Reaktion die 25°C erfolgte durch Zugabe von 50 µl einer bei 25°C thermostatisierten Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen und 1,2 mmol/l ATP jeweils die doppelte der auf der Abszisse angegebenen [^{14}C]UTP-Konzentrationen (2 µCi/µmol) zwischen 0,02 und 2 mmol/l enthielt. Durch den zeitlichen Verlauf des Einbaus von [^{14}C]cMP wurde die jeweilige Geschwindigkeit der RNA- und DNTP-Bildung in An (■,●)- und Abwesenheit (□,○) von Rifampicin bestimmt und als Syntheserate/h gegen die UTP-Konzentration in der Reaktionsmischung aufgetragen.

b. Verwendung von nicht nachgereinigtem ATP und UTP als Substrat

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen von Fig. 7a mit den Unterschieden identisch, daß in der Vorinkubationslösung 1,8 µg RNA Polymerase Holoenzym und 17,5 µg T4 DNA eingesetzt, und in der Substratlösung an Stelle von doppelt gereinigten Substraten nicht nachgereinigtes ATP und [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) verwendet wurde.

UTP-Konzentration jedoch keine zusätzliche Erhöhung der Bildungsrate. Vielmehr nimmt diese bei Konzentrationen größer 0,4 mmol/l wieder ganz leicht ab.

Nun ist es nicht ganz auszuschließen, daß die Ribonucleosidtriphosphate ATP und UTP selbst nach intensiver Reinigung nicht ganz frei von verunreinigendem GTP und CTP sind (vgl. Ergebnisse, Kap. I.4, Anm. 5). Dies bedeutet aber, daß bei der Erhöhung der UTP-Konzentration gleichzeitig auch die GTP und CTP-Konzentration ansteigt. Daher kann bei hohen UTP-Konzentrationen parallel zur DNTP-Synthese die Bildung von Polyribonucleotiden auftreten.

Tatsächlich beobachtet man gleichzeitig mit der Reduktion der DNTP-Synthese in zunehmendem Umfang die wenn auch geringe, so doch deutlich meßbare Bildung hochmolekularer RNA (Fig. 7a). Jedoch ist die Steigerung dieser RNA-Synthese nicht proportional zur Reduktion der DNTP-Bildung, sondern deutlich geringer. Dies hat seine Ursache darin, daß die Substratkonzentration für die DNTP-Synthese bei hohen UTP-Konzentrationen optimal, für die Bildung langer RNA-Ketten wegen der geringen GTP- und CTP-Konzentrationen stark limitierend wirkt. So kann zwar die Bildung langer RNA-Ketten optimal initiiert werden, doch ist die Geschwindigkeit der Elongationsreaktion stark reduziert (vgl. Ergebnisse, Kap. I,1).

Nun ist aber der ternäre Elongationskomplex schon nach der Bildung eines Trinucleotids stabil (Dausse et al., 1976). Somit bewirkt schon die Synthese dieses kurzen RNA-Moleküls die Reduktion der DNTP-synthetisierenden Enzym-DNA-Komplexe. Dadurch wird verständlich, daß auf Grund der langsamen Elongationsgeschwindigkeit die nur geringe RNA-Bildung trotzdem eine starke Erniedrigung der DNTP-Syntheserate zur Folge hat.

Festzuhalten ist, daß die zunehmende Reduktion der DNTP-Synthese bei hohen UTP-Konzentrationen wiederum auf die Steigerung der parallelen RNA-Reaktion zurückzuführen ist.

Diese Steuerung der DNTP-Syntheserate durch das Ausmaß der parallelen RNA-Bildung wird besonders deutlich, wenn man an Stelle hochgereinigter Ribonucleosidtriphosphate nur in üblicher Weise gereinigtes ATP und UTP der Inkubationsmischung zusetzt (Fig. 7b).

Wiederum ist bei niedrigen UTP-Konzentrationen eine starke Zunahme der DNTP-Synthese festzustellen. Oberhalb 0,05 mmol/l UTP knickt die Abhängigkeit

wiederum ab. Jedoch wird die DNTP-Bildung wegen der höheren Konzentration an verunreinigendem GTP und CTP weitaus stärker gehemmt. So beträgt die Syntheserate bei 1 mmol/l UTP nur noch 7 % derjenigen, die bei 0,05 mmol/l beobachtet wurde.

Dementsprechend ist die Steigerung der parallelen RNA-Synthese bei hohen UTP-Konzentrationen auch wesentlich ausgeprägter. Bei 1mmol/l UTP kann das fünffache der RNA-Bildungsrate beobachtet werden, die unter gleichen Bedingungen mit hochgereinigtem ATP und UTP erhalten wurde (Fig. 7a).

Der Verlauf der UTP-Abhängigkeit der DNTP-Synthese wird nun durch Rifampicin grundlegend verändert. Zwar steigt die DNTP-Bildungsrate bei kleinen UTP-Konzentrationen wiederum stark an, nimmt jedoch im Gegensatz zum rifampicinfreien System auch oberhalb 0,07 mmol/l stetig zu und nähert sich einem Grenzwert (Fig. 7a und 7b). Gleichzeitig unterbindet der Hemmstoff unabhängig vom Reinheitsgrad der verwendeten Ribonucleosidtriphosphate die parallele RNA-Synthese über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich. Dies hat zur Folge, daß die Bildung von DNTP bei allen UTP-Konzentrationen ohne den reduzierenden Einfluß der RNA-Synthese ablaufen kann [6].

Nun spielt die Bildung von RNA-Ketten bei niedrigen UTP-Konzentrationen auch in Abwesenheit des Hemmstoffs nur eine geringe Rolle. Daher zeigt der ähnliche Verlauf der Abhängigkeiten unterhalb 0,07 mmol/l (Fig. 7a) bzw. 0,05 mmol/l (Fig. 7b) wiederum, daß das Antibiotikum die Bildungsgeschwindigkeit von DNTP direkt nur in geringem Maße erniedrigt, also nur wenig beeinflußt.

Somit muß die Steigerung der DNTP-Synthese durch Rifampicin bei hohen ATP- und UTP-Konzentrationen auch in diesem Fall primär auf die spezifische Blokkierung der parallel ablaufenden RNA-Restsynthese zurückgeführt werden.

---

6) Die Untersuchung der Wirkung von Rifampicin auf die Anlagerung der Substrate durch die Anwendung der Analyse von Michaelis und Menten (1913) und der graphischen Auswertung nach Lineweaver und Burk (1934) erfolgte nicht, da [illegible] nur [illegible] reversibel bindender Inhibitoren beschreibt [illegible]. [illegible] ist die Reversibilität dergestalt definiert, daß die Wirkung des Inhibitors durch Verdünnung oder Dialyse rückgängig gemacht werden kann. Wie [illegible] Dissoziationskonstante des Rifampicin-RNA Polymerase-Komplexes von [illegible] x 10^{-10} M [illegible] bzw. [illegible] x 10^{-10} M 28° C zeigt (Wehrli, [illegible]), ist die Reversibilität bei der Anlagerung von Rifampicin an RNA Polymerase jedoch nur bedingt gegeben (vgl. auch Wehrli et al., 1976).

5b. ATP-Abhängigkeit

Bestimmt man die Wirkung von Rifampicin auf die ATP-Abhängigkeit der DNTP-Synthese, so wird wiederum deutlich, daß die Blockierung der parallelen RNA-Bildung die primäre Wirkung des Hemmstoffs darstellt.

Zunächst wurde der Einfluß der ATP-Konzentration auf die DNTP-Synthese bei einer UTP-Konzentration von 0,07 mmol/l bestimmt. Fig. 8a zeigt, daß der Verlauf der Abhängigkeit auch in Abwesenheit von Rifampicin durch eine Sättigungskurve beschrieben werden kann.

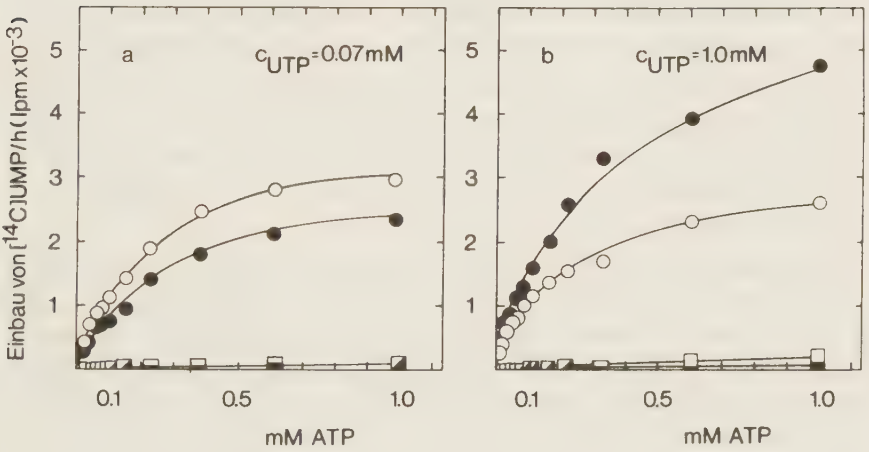


Fig. 8 Einfluß von Rifampicin auf die ATP-Abhängigkeit der DNTP-Synthese

a. Verwendung von doppelt gereinigtem ATP und UTP als Substrat (vgl. Methoden, Kap. 2a und 2b) (c_{UTP} = 0,07 mmol/l)

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen von Fig. 7a mit dem Unterschied identisch, daß die Substratlösungen jeweils 0,07 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) und die doppelte auf der Abszisse angegebene ATP-Konzentration zwischen 0,044 und 2,0 mmol/l enthielt.

b. Verwendung von doppelt gereinigtem ATP und UTP als Substrat (vgl. Methoden, Kap. 2a und 2b) (c_{UTP} = 1,0 mmol/l)

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen von Fig. 8a mit dem Unterschied identisch, daß in der Substratlösung 1,0 mmol/l [^{14}C]UTP verwendet wurde.

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, (Fig. 7a), spielt die Reduktion der DNTP-Bildungsrate durch die parallele RNA-Synthese bei dieser UTP-Konzentration selbst bei hohen ATP-Konzentrationen keine nennenswerte Rolle. Daher ist es nicht verwunderlich, daß Rifampicin den Verlauf der ATP-Abhängigkeit der DNTP-Bildung nicht verändert. Über den gesamten Konzentrationsbereich bewirkt das Antibiotikum lediglich die schon in früheren Experimenten (vgl. Fig. 5 und 6) beobachtete leichte Erniedrigung der Synthesegeschwindigkeit. Dementsprechend wird auch die nur geringe Bildung langkettiger RNA durch den Hemmstoff nur wenig reduziert.

Die nur geringe Erniedrigung der DNTP-Syntheserate unter diesen Bedingungen, bei denen diesmal durch die relativ niedrige UTP-Konzentration die RNA-Parallelreaktion weitgehend verhindert ist, zeigt wiederum, daß Rifampicin die Geschwindigkeit der DNTP-Bildung direkt nur wenig beeinflußt.

Die Wirkung des Antibiotikums verkehrt sich ins Gegenteil, wenn der Einfluß der ATP-Konzentration bei der sehr hohen UTP-Konzentration von 1 mmol/l bestimmt wird. Diese verglichen mit den normalen Inkubationsbedingungen erhöhte UTP-Konzentration wurde gewählt, damit die Wirkung des Hemmstoffs deutlich beobachtet werden kann.

In Fig. 8b ist sehr gut zu erkennen, daß Rifampicin unter diesen Bedingungen die DNTP-Bildung nicht erniedrigt, sondern bei Steigerung der ATP-Konzentration zunehmend stärker erhöht. Die damit verbundene Reduktion der RNA-Restsynthese in Anwesenheit des Hemmstoffs veranschaulicht, daß auch in diesem Fall die Steigerung der DNTP-Bildung auf die Blockierung der parallelen RNA-Restsynthese zurückzuführen ist.

Aus den bisherigen Experimenten ergibt sich zusammenfassend, daß E. coli RNA Polymerase prinzipiell sowohl die Synthese langkettiger RNA als auch die Bildung von DNTP katalysieren kann. Das Ausmaß der Katalyse dieser beiden Reaktionsprodukte ist nicht unabhängig voneinander und wird durch die Konzentration der für die Elongation initiierter RNA-Ketten essentiellen Ribonucleosidtriphosphate GTP und CTP gesteuert.

Die spezifische Wirkung von Rifampicin liegt nun darin, daß die Synthese langkettiger RNA fast vollständig inhibiert wird. Demgegenüber wird die Bildung von DNTP durch das Antibiotikum direkt nur wenig beeinflußt.

Dies hat zur Folge, daß der Hemmstoff selbst bei hohen Konzentrationen al-

ler vier Ribonucleosidtriphosphate die Katalyse von DNTP erzwingt. Weiterhin ergibt sich, daß auch die Steigerung der DNTP-Synthese durch Rifampicin bei sehr kleinen GTP- und CTP-Konzentrationen auf den Primäreffekt der Inhibierung der RNA-Synthse zurückgeführt werden muß. Selbst in Abwesenheit dieser beiden Ribonucleosidtriphosphate bewirkt der Hemmstoff die vermehrte Bildung von DNTP nicht durch die direkte Erhöhung der Synthesegeschwindigkeit, sondern durch die spezifische Blockierung verschiedener noch in geringem Ausmaß ablaufenden RNA-Restsynthesen.

II. Einfluß von Temperatur, Protonenkonzentration und Ionenstärke auf die DNTP- und RNA-Synthese

Die vorausgehenden Untersuchungen zeigten, daß Rifampicin die Katalyse von DNTP nur wenig beeinflußt. Es erhob sich nun die Frage, ob diesem Befund allgemeine Bedeutung zukommt, oder ob die nur geringe Wirkung des Antibiotikums auf die Bildung von DNTP lediglich den speziellen Inkubationsbedingungen zuzuschreiben ist.

Daher wurde die Wirkung des Hemmstoffs auf die Bildungsrate von DNTP in Abhängigkeit der Reaktionsparameter Temperatur, Protonenkonzentration und Ionenstärke untersucht. Weitergehend wurden die Abhängigkeiten der DNTP-Synthese mit denen der RNA-Bildung verglichen. Durch diesen Vergleich sollten sich Hinweise darauf ergeben, ob die DNTP-Synthese mit der Initiationsreaktion der RNA-Synthese nicht nur formal, sondern auch in mechanistischer Hinsicht identisch ist und somit durch das gleiche aktive Zentrum der RNA Polymerase katalysiert wird [7].

---

7) Rein formal kann der Ablauf der DNTP-Synthese bis zur Abdissoziation des gebildeten DNTP durch die Reaktionsschritte der Initiation langer RNA-Ketten beschrieben werden. Diese Definition schlug erstmals Anthony et al., (1969) vor. Danach ist die Initiationsreaktion der RNA-Synthese als die Kondensation zweier Ribonucleosidtriphosphate unter Abspaltung von Pyrophosphat definiert. Im Gegensatz dazu ist der Vorgang der Elongation durch das schrittweise Anknüpfen eines Ribonucleosidtriphosphats an das 3'-OH-Ende der wachsenden RNA-Kette ebenfalls unter Pyrophosphatabspaltung charakterisiert (vgl. auch Chamberlin, 1976). Nun kann die RNA-Synthese aber nicht nur durch die Verknüpfung zweier Ribonucleosidtriphosphate, sondern ebenfalls durch die Verknüpfung von Analogen des Purin-Ribonucleosidtriphosphats (vgl. Krakow et al., 1976), Dinucleosidmonophosphat (So und Downey, 1970; Downey et al., 1971; Hoffmann und Niyogi, 1973; Minkley und Pribnow, 1973; Dausse et al., 1975; Axelrod, 1976; Rüger, 1978; Patrushev et al., 1978; Shemyakin et al., 1978), Oligoribonucleotide (Niyogi und Stevens, 1965; Terao et al., 1972; Axelrod, 1976; Petrushev et al., 1978) und Oligodeoxyribonucleotide (Straat et al., 1971; Smith und Martinez, 1974) mit dem folgenden Ribonucleosidtriphosphat initiiert werden. In allen diesen Fällen trifft die Definition von Anthony et al. (1969) (vgl. auch Chamberlin, 1976) nicht zu. Daher sollte die Initiation der RNA-Synthese besser in der Weise definiert werden, daß alle Reaktionsschritte der RNA-Bildung, die auch noch nach der Bindung von Rifampicin an die RNA Polymerase ablaufen können, als Initiation, dagegen alle Vorgänge, die durch das Antibiotikum verhindert werden, als Elongation bezeichnet werden (zur Initiation vgl. Ergebnisse, Kap. III).

Bei der Durchführung der Experimente wurde berücksichtigt, daß der eigentlichen DNTP- und RNA-Synthese stark von der Temperatur und der Ionenstärke abhängige Reaktionen vorgelagert sind.

So nimmt die Anlagerungsgeschwindigkeit von Rifampicin an E. coli RNA Polymerase Holoenzym bei Erniedrigung der Temperatur von 37°C auf 0°C auf nahezu das hundertfache ab (Wehrli et al., 1976). Auch wird die Bindung des Holoenzyms an spezifische Matrizen wie T4 DNA stark von der Temperatur und der Ionenstärke beeinflußt (Hinkle und Chamberlin, 1972). Sowohl Zillig et al. (1970) mit Hilfe vonHeparin als auch Kerrich-Santo und Hartmann (1974) mit Hilfe von Rifampicin konnten zeigen, daß die Bildung des spezifischen Praeinitiationskomplexes an T4 DNA als Matrize durch die Einstellung eines der Initiation der RNA-Synthese vorgelagerten Gleichgewichts zweier Enzym-DNA-Zustände bestimmt wird. Die Einstellung dieses Gleichgewichts hängt sowohl von der Temperatur als auch von der Ionenstärke ab (Schäfer und Zillig, 1973; Mangel und Chamberlin, 1974b; 1974c).

Wie nachfolgende Untersuchungen zeigen (vgl. Ergebnisse, Kap. III), spielt die Einstellung dieses der Synthesereaktion vorgelagerten Gleichgewichts auch bei der DNTP-Bildung eine entscheidende Rolle. Um eine Überlagerung der DNTP-Bildung durch Reaktionsschritte, die dem Ablauf der eigentlichen Synthese vorausgehen, auszuschalten, wurden die Reaktionskomponenten schrittweise der Inkubationslösung zugegeben. Die Reihenfolge der Zugabe wurde so gewählt, daß alle Prozesse bei der Bildung des spezifischen Praeinitiationskomplexes vollständig ablaufen konnten.

Diese Definition hat nicht nur den Vorteil, daß bei dieser Unterscheidung viele möglichen Arten der Initiation der RNA-Synthese wie die Verknüpfung von Tri-, Di- und Monophosphaten (Johnston und McClure, 1976; Kessler und Hartmann, 1977; Smagowicz und Scheit, 1977; McClure und Cech, 1978), ATP-Analogen wie α,β-Methylen-ATP (vgl. Ergebnisse, Kap. I.4; McClure und Cech, 1978) Dinucleosidmonophosphat (McClure und Cech, 1978; Smagowicz und Scheit, 1978; Oen und Wu, 1978) oder Trinucleosiddiphosphat (Oen und Wu, 1978) mit dem folgenden Ribonucleosidtriphoaphat enthalten sind, sondern daß zusätzlich der Vorgang der Initiation der RNA-Synthese experimentell klar faßbar ist. Diese Definition schließt aber ein, daß in den speziellen Fällen der Di- und Monophosphate der Vorgang der Initiation der RNA-Synthese erst nach der Knüpfung der zweiten Phosphordiesterbindung abgeschlossen ist (McClure und Cech, 1978).

So wurde zunächst das freie Enzym mit Rifampicin vorinkubiert, da hierdurch die gegenüber der Anlagerung des Antibiotikums bestehende Abschirmung des Enzyms durch DNA verhindert wird (vgl. Ergebnisse, Kap. I.2; V.A.3).

Da der Wirkstoff die Anlagerung des Enzyms an die Matrize nicht verhindert (Hinkle et al., 1972), wurde erst danach T4 DNA zugesetzt und die Vorinkubation fortgesetzt. Die Dauer der beiden Vorinkubationen wurde so gewählt, daß diese Anlagerungsprozesse vollständig ablaufen konnten. Der Beginn der Reaktion erfolgte im Falle der DNTP-Synthese durch Zugabe von ATP und UTP, während die RNA-Bildung durch das Hinzufügen aller vier Ribonucleosidtriphosphate gestartet wurde.

1. Einfluß der Temperatur

Walter et al. (1967) konnten zeigen, daß die Katalyse der Bildung langkettiger RNA durch E. coli RNA Polymerase an T4 DNA stark von der Temperatur abhängig ist. Kessler und Hartmann (1977) berichteten, daß auch die Bildung von DNTP an dieser Matrize durch die Temperatur beeinflußt wird. So wurde bei der Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 37°C eine enorme Steigerung der DNTP-Syntheserate beobachtet. Weiterhin stellten diese Autoren fest, daß Rifampicin diese Steigerung der Bildungsgeschwindigkeit abschwächt, da die DNTP-Syntheserate in Anwesenheit des Antibiotikums bei 25°C oberhalb, bei 37°C jedoch unterhalb des jeweiligen Werts im rifampicinfreien System liegt.

Um die Wirkung des Antibiotikums auf die Bildung von DNTP genauer festlegen zu können, wurde zunächst der Einfluß der Temperatur auf das Ausmaß der DNTP-Synthese in An- und Abwesenheit des Wirkstoffs innerhalb eines weiten Temperaturbereichs studiert.

Das Ausmaß der DNTP-Synthese hängt allerdings nicht nur von der Temperatur, sondern auch von der Protonenkonzentration ab (vgl. Ergebnisse, Kap. II.2). Um die Überlagerung eines pH- und Temperatureffekts zu vermeiden, wurde bei der Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der DNTP-Synthese das stark temperaturabhängige Tris-HCl-Puffersystem ($pK_a/^{\circ}C = -0{,}036$) durch das weniger abhängige HEPES NaOH-Puffersystem ($pK_a/^{\circ}C = -0{,}014$) ersetzt (Good et al., 1966).

In Fig. 9a ist deutlich zu sehen, daß die DNTP-Syntheserate an T4 DNA äußerst stark von der Temperatur beeinflußt wird. Während bei 0°C die Kataly-

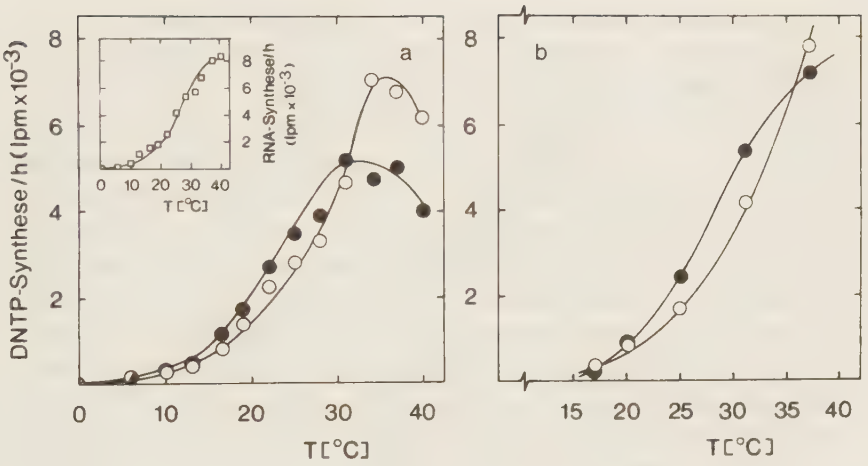


Fig. 9 Temperaturabhängigkeit der DNTP- und RNA-Synthese

a. Temperaturabhängigkeit der DNTP- und RNA-Synthese an T4 DNA

1. DNTP-Synthese

In zwei parallelen Ansätzen wurde unter Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1b) je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym in der Salzmischung A, die an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH, pH 7,9 bei der jeweiligen auf der Abszisse angegebenen Temperatur enthielt, in An- und Abwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin bei der jeweils angegebenen Temperatur vorinkubiert. Die Zeitspanne dieser Vorinkubation betrug bei 0, 6 und 10°C 30 min, bei 13 und 16°C 20 min, bei 19 und 22°C 12,5 min, bei 25 und 28°C 10 min, bei 31 und 34°C 7,5 min und bei 37 und 40°C 5min. Danach wurde bei der jeweils gleichen Temperatur je 17,5 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 50 µl), und die Inkubation nochmals innerhalb der oben angegebenen Zeitspannen fortgesetzt. Der Start der Reaktion bei der jeweils angegebenen Temperatur erfolgte durch Zugabe von 50 µl bei der jeweiligen Temperatur thermostatisierten Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationrn an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH, pH 7,9 bei der jeweils angegebenen Temperatur, 1,2 mmol/l und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Nach 10, 20 und 30 min wurden je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen, und der zeitliche Verlauf des Einbaus von [^{14}C]UMP in DNTP bestimmt. Daraus wurde die Geschwindigkeit der DNTP-Bildung in An (●)- und Abwesenheit (○) von Rifampicin bestimmt, und als Syntheserate/h gegen die Temperatur aufgetragen.

2. RNA-Synthese

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen der DNTP-Synthese in Abwesenheit von Rifampicin (Fig. 9a) mit den Unterschieden identisch, daß einerseits die Substratlösung je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP

se von DNTP nicht nachzuweisen ist, nimmt die DNTP-Bildungsrate bei Erhöhung der Temperatur immens zu, wobei ein Abknicken der Syntheserate erst oberhalb 37°C festzustellen ist.

Betrachtet man nun den Einfluß von Rifampicin auf die Temperaturabhängigkeit der DNTP-Synthese, so ist offensichtlich, daß der Verlauf der Temperaturabhängigkeit nur wenig verändert wird (Fig. 9a). Dies bedeutet, daß das Antibiotikum im Bereich von 0 bis 30°C die Bildung von DNTP nur wenig beeinflußt. So nimmt die DNTP-Syntheserate auch in Gegenwart von Rifampicin bei Erhöhung der Temperatur im Bereich zwischen 0 und 30°C stark zu. Allerdings ist die Bildungsrate immer etwas größer als im rifampicinfreien System. Diese Wirkung des Antibiotikums ist auf die Verhinderung der parallel ablaufenden RNA-Restsynthese zurückzuführen (vgl. Ergebnisse, Kap. I). Im Gegensatz zur unbeeinflußten DNTP-Synthese ist ein Abknicken der Syntheserate in Gegenwart von Rifampicin schon oberhalb 30°C festzustellen. Dies hat zur Folge, daß im Unterschied zu Temperaturen unterhalb 30°C, wo das Antibiotikum ja eine leichte Steigerung der DNTP-Syntheserate verursacht, oberhalb dieser Temperatur eine Reduktion der Bildung von DNTP bewirkt, die bei 37°C etwa 30 % ausmacht.

Wird an Stelle von T4 DNA die DNA der Mutante D111 des Phagen T7 (Studier, 1974) als Matrize verwendet, so wird ebenfalls kontinuierlich DNTP gebildet (vgl. Ergebnisse, Kap. IV.1, Fig. 24). Untersucht man nun an dieser Matrize den Einfluß der Temperatur auf die Bildung von DNTP, so beobachtet man einen ähnlichen Temperaturverlauf der DNTP-Syntheserate wie an T4 DNA (Fig. 9b). Auch der Einfluß von Rifampicin ändert sich nur wenig. Lediglich bei hohen Temperaturen knickt die DNTP-Bildung in Anwesenheit des Antibiotikums nicht

---

(2 μCi/μmol) enthielt, andererseits die RNA-Bildungsrate/h (□) bei Temperaturen oberhalb 10°C aus dem Einbau von [^{14}C]UMP während der ersten 4 min der Reaktion, unterhalb 10°C während der ersten 6 min der Reaktion errechnet wurde.

b. Temperaturabhängigkeit der DNTP-Synthese an T7 D111 DNA

Die experimentellen Bedingungen entsprachen denen von Fig. 9a1 mit dem Unterschied, daß jeweils an Stelle von 17,5 μg T4 DNA 16,5 μg T7 D111 DNA verwendet wurde.

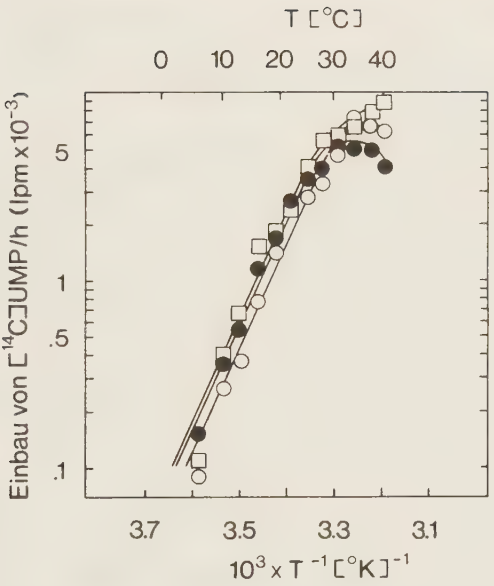


Fig. 10 Arrhenius'sche Auftragung der Temperaturabhängigkeiten der DNTP- und RNA-Synthese

Die reziproken Syntheseraten der DNTP-Synthese in An (●) - und Abwesenheit (○) von 2 µg/ml Rifampicin (Fig. 9a) und der RNA-Synthese (□) (Fig. 9b) wurden halblogarithmisch als Funktion der reziproken Temperatur aufgetragen. Die Berechnung der Arrhenius'schen, scheinbaren Aktivierungsenthalpie erfolgte aus der Steigung des linearen Anteils der Abhängigkeiten zwischen 0 und 25°C.

so stark wie bei T4 DNA als Matrize ab. Jedoch liegt auch bei dieser DNA die DNTP-Syntheserate in Anwesenheit von Rifampicin bei 25°C oberhalb, bei 37°C unterhalb der jeweiligen Bildungsraten im rifampicinfreien System.

Diese Umpolung der Wirkung des Antibiotikums auf die DNTP-Synthese bei Erhöhung der Temperatur von 25 auf 37°C steht in Einklang mit den früher beschriebenen Versuchen von Kessler und Hartmann (1977) und wird auch durch die Ergebnisse anderer Autoren an λb2 DNA als Matrize bestätigt (McClure und Cech, 1978).

Vergleicht man den Verlauf der Temperaturabhängigkeit der DNTP-Synthese mit der der Bildung langkettiger RNA, so stellt man fest, daß die Temperatur die Synthese beider Katalyseprodukte der RNA Polymerase in sehr ähnlicher Weise beeinflußt (Fig. 9a).

Die weitgehende Übereinstimmung der Temperaturabhängigkeiten der DNTP- und RNA-Synthese manifestiert sich sehr deutlich in den identischen Steigungen im Arrhenius'schen halblogarithmischen T^{-1}-Diagramm innerhalb des Temperaturbereichs zwischen 0 und 25°C (Fig. 10). Aus der Steigung der parallelen Geraden ergibt sich für beide Reaktionen in diesem Temperaturbereich die Arrhenius'sche, scheinbare Aktivierungsenthalpie von 110 kJ/mol = 26 kcal/mol. Ein ähnlich hoher Energiewert von 23 kcal/mol = 96 kJ/mol wurde auch schon von Walter et al. (1967) beim Studium der Synthese hochmolekularer RNA an T4 DNA beobachtet. Kerrich-Santo und Hartmann (1974) und Mangel und Chamberlin (1974c) identifizierten den stark temperaturabhängigen Reaktionsschritt mit der Einstellung des Gleichgewichts zweier verschiedener Enzym-DNA-Zustände während der Bildung des spezifischen Praeinitiationskomplexes [8].

Die Identität des Verlaufs der Temperaturabhängigkeiten im Bereich zwischen 0 und 25°C legt nun nahe, daß in diesem Temperaturbereich das Ausmaß nicht nur der RNA-Synthese, sondern auch der DNTP-Synthese durch den gleichen Reaktionsschritt bestimmt wird.

Dies ist ein erster Hinweis darauf, daß die Initiation langkettiger RNA und die DNTP-Bildung bis zur Abdissozation des gebildeten DNTP identische Prozesse sind und somit wohl durch das gleiche aktive Zentrum der RNA Polymerase katalysiert werden.

---

8) Mangel und Chamberlin (1974) ermittelten für die Höhe der Energiebarriere zwischen den beiden Enzym-DNA-Zuständen einen Enthalpiewert von 57 kcal/mol = 238 kJ/mol. Berechnet man jedoch die für diese Bestimmung notwendigen Werte der Gleichgewichtskonstanten bei den verschiedenen Temperaturen aus den angegebenen Meßdaten der RNA-Restaktivität in Gegenwart von Rifampicin, so stellt man fest, daß diese mit den angegebenen Werten bei weitem nicht übereinstimmen (Tab. 2).

2. Einfluß der Protonenkonzentration

Um die Wirkung von Rifampicin auf die DNTP-Synthese noch genauer charakterisieren zu können, wurde die Syntheserate der DNTP-Bildung in An- und Abwesenheit des Antibiotikums bei verschiedenen Protonenkonzentrationen im Bereich zwischen pH 6 und 9 bestimmt.

Wiederum wurde das Tris HCl-Puffersystem durch das HEPES NaOH-Puffersystem ersetzt, da dieses im Gegensatz zum Tris HCl-System (pK_a = 8,3/20°C) mit einem pK_a von 7,55/20°C den untersuchten pH-Bereich am besten abpuffert (Good et al., 1966).

Fig. 11 zeigt, daß das Ausmaß der DNTP-Synthese vom pH-Wert der Inkubationslösung beeinflußt wird. Während bei pH = 6 die Reaktion nur zu 50 % des opti-

Tab. 2 Berechnung der Gleichgewichtskonstanten des vorgelagerten Gleichgewichts nach Mangel und Chamberlin (1974)

T	$T^{-1}x10^4$	Aktivität	100-Aktivität	K
°C	$°K^{-1}$	%	%	
0	3,663	0	100	0
6	3,584	3	97	0,031
10	3,534	12	88	0,136
16	3,460	33	67	0,439
20	3,413	45	55	0,818
27	3,333	59	41	1,439
37	3,226	56	44	1,273

Dieser Fehler bei der Berechnung der K-Werte hat zur Folge, daß auch die Größe der Reaktionsenthalpie falsch bestimmt wurde. Aus den richtig berechneten K-Werten läßt sich im van't Hoff'schen T^{-1}-Diagramm ein Enthalpiewert von 130 kJ/mol = 31 kcal/mol bestimmen. In analoger Weise ergibt sich aus den von Kerrich-Santo und Hartmann (1974) angegebenen Werten ein Enthalpiewert von 109 kJ/mol = 26 kcal/mol.

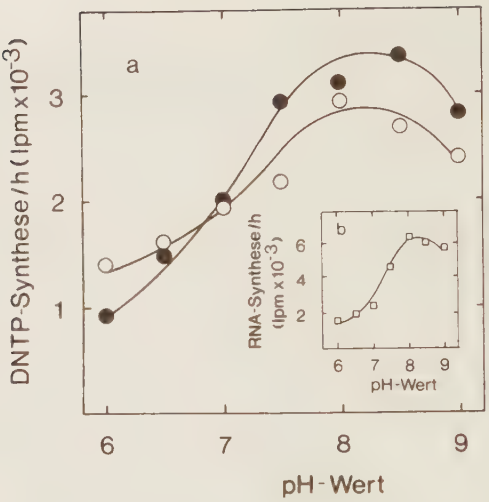


Fig. 11 pH-Abhängigkeit der DNTP- und RNA-Synthese

a. DNTP-Synthese

In zwei parallelen Ansätzen wurde unter den Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1b) je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym in der Salzmischung A, die an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH, dessen pH-Wert bei 25°C dem jeweiligen auf der Abszisse angegebenen Wert entsprach, enthielt, in An- und Abwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde je 17,5 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 50 µl), und die Inkubation für weitere 10 min bei 25° fortgesetzt. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte durch Zugabe von 50 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C 50 mmol/l des oben beschriebenen HEPES NaOH-Puffers, 1,2 mmol/l ATP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Die Auswertung erfolgte wie in Fig. 9a.

(●) DNTP-Syntheserate (+Rif), (○) DNTP-Syntheserate (-Rif)

b. RNA-Synthese

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen der DNTP-Synthese in Abwesenheit von Rifampicin (Fig. 11a) mit dem Unterschied identisch, daß die Substratlösung je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt.

(□) RNA-Syntheserate

malen Werts katalysiert wird, steigt die Bildungsrate bei Erhöhung des pH-Werts an und durchläuft zwischen pH 8,0 und 8,5 ein breites Optimum.

Grundsätzlich wird der Verlauf dieser Abhängigkeit durch Rifampicin wiederum nicht verändert (Fig. 11a). So nimmt auch in Anwesenheit des Antibiotikums die Synthese von DNTP bei der Erhöhung des pH-Werts von 6 auf 8 stark zu, während jenseits des Optimums bei pH 8,0 bis 8,5 bei weiterer Erhöhung des pH-Werts wieder eine leichte Reduktion der Bildungsrate zu beobachten ist. Jedoch ist der Anstieg der DNTP-Syntheserate bei der Steigerung des pH-Werts von 6 auf 8 im rifampicinhaltigen System etwas steiler als in Abwesenheit des Antibiotikums. Dies hat wiederum eine Umpolung der Wirkung des Hemmstoffs zur Folge. So läuft die DNTP-Bildung in Abwesenheit von Rifampicin unterhalb pH 7 vermehrt, oberhalb dieses Werts jedoch vermindert ab.

Die verminderte Erhöhung der DNTP-Syntheserate im rifampicinfreien System ist wohl wiederum darauf zurückzuführen, daß bei der Erhöhung des pH-Werts die in Abwesenheit des Hemmstoffs noch mögliche RNA-Parallelreaktion immer stärker hervortritt.

Dies wird bestätigt durch die Analyse der pH-Abhängigkeit der RNA-Synthese, da bei der Steigerung des pH-Werts von 6 auf 8 die Bildung langkettiger RNA immer besser katalysiert wird (Fig. 11b). Oberhalb dieser Protonenkonzentration nimmt die RNA-Syntheserate wieder ab. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen von Stevens und Henry (1963). Diese Autoren fanden an T2 DNA als Matrize, daß die Aktivität der RNA Polymerase bei Erhöhung des pH-Werts von 7,2 auf 8,4 ebenfalls ansteigt. Auch die Transkription von Lachssperma DNA zeigt einen ähnlichen Verlauf (Chamberlin und Berg, 1962).

Vergleicht man nun den Verlauf der pH-Abhängigkeit der RNA-Synthese mit dem der DNTP-Synthese, so stellt man fest, daß die Protonenkonzentration die Katalyse beider Reaktionsprodukte in gleicher Weise beeinflußt. Dies weist wiederum darauf hin, daß das Ausmaß beider Katalyseprodukte durch einen identischen Reaktionsschritt bestimmt wird und daher wohl auch durch das gleiche aktive Zentrum der RNA Polymerase katalysiert wird.

3. Einfluß der Ionenstärke

Um weitere Klarheit über den Einfluß von Rifampicin auf die DNTP-Synthese zu erhalten, wurde die Wirkung des Antibiotikums auf die Bildung von DNTP auch

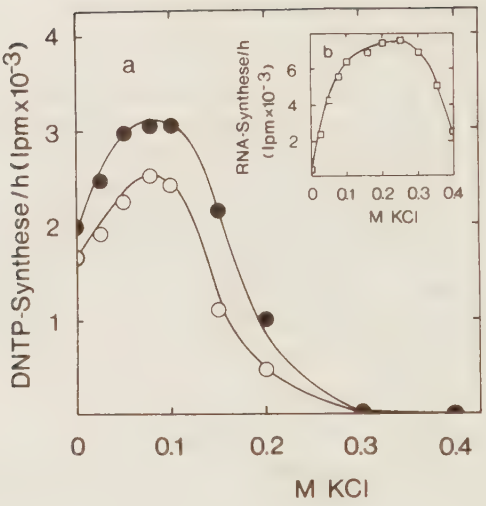


Fig. 12 KCl-Abhängigkeit der DNTP- und RNA-Synthese

a. DNTP-Synthese

In zwei parallelen Ansätzen wurde unter Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1b) je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym in der Salzmischung A, deren KCl-Gehalt dem jeweils auf der Abszisse angegebenen Wert entsprach, in An- und Abwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde jeweils 17,5 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 50 µl), und die Inkubation für weitere 10 min bei 25°C fortgesetzt. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte durch Zugabe von 50 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die an Stelle von 80 mmol/l KCl die auf der Abszisse jeweils angegebene Konzentration an KCl, 1,2 mmol/l ATP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Die Auswertung erfolgte wie in Fig. 9a.

(●) DNTP-Syntheserate (+Rif)

(○) DNTP-Syntheserate (-Rif)

b. RNA-Synthese

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen der DNTP-Synthese in Abwesenheit von Rifampicin (Fig. 12a) mit dem Unterschied identisch, daß die Substratlösung je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt.

(□) RNA-Syntheserate

bei unterschiedlicher Ionenstärke bestimmt. Dabei wurde die KCl-Konzentration zwischen O und O,4 mol/l variiert.

Der Verlauf der KCl-Abhängigkeit der DNTP-Bildung wird durch eine Optimumskurve beschrieben (Fig. 12a). Bis zu einer KCl-Konzentration von O,O5 mol/l nimmt die Syntheserate zu und durchschreitet im Bereich zwischen O,O5 und O,1 mol/l ein Optimum. Die weitere Erhöhung der Salzkonzentration hat jedoch eine sehr starke Abnahme der DNTP-Bildung zur Folge, so daß oberhalb O,3 mol/l die Synthese von DNTP nicht mehr beobachtet werden kann. Dieser starke Abfall wurde auch von McClure et al. (1978) an λb2 DNA und Shemyakin et al. (1978) mit poly [dA:dT] als Matrize beobachtet.

Wie man sofort sieht, wird auch der Verlauf der KCl-Abhängigkeit der DNTP-Bildung durch Rifampicin nur wenig beeinflußt (Fig. 12a). Die Syntheseraten liegen lediglich etwas niedriger als die jeweils analogen Werte im rifampicinfreien System. Diese Reduktion ist wiederum ein Ausdruck für die in Abwesenheit des Hemmstoffs noch mögliche RNA-Parallelreaktion.

Diese Vorstellung wird bestätigt durch den Verlauf der KCl-Abhängigkeit der Bildung langkettiger RNA (Fig. 12b). Während die Syntheserate ohne KCl sehr gering ist, nimmt die Bildungsrate bei der Steigerung der Ionenstärke rasch zu. Innerhalb des sehr breiten Bereichs zwischen O,1 und O,3 mol/l verläuft die RNA-Synthese mit ähnlicher Geschwindigkeit ab. Das sehr breite Optimum dieser Salzabhängigkeit wird verursacht durch die Überlagerung der Abhängigkeiten entgegengesetzt beeinflußter Teilprozesse der RNA-Synthese.

So erfolgt die Initiation langkettiger RNA optimal bei niedriger Ionenstärke (Kerrich, 1973; Mangel und Chamberlin, 1974b). Die gute Übereinstimmung mit der Salzabhängigkeit des Dissoziationsgleichgewichts des Enzym-DNA-Komplexes macht deutlich, daß das Ausmaß der Initiation hauptsächlich durch die bei hoher Ionenstärke stark reduzierte Stabilität des spezifischen Praeinitiationskomplexes bestimmt wird (Jones und Berg, 1966; So und Downey, 197O; Hinkle und Chamberlin, 1972; Giacomoni, 1976). Im Gegensatz dazu wird die Elongationsreaktion bei hohen Ionenstärken begünstigt (Fuchs et al., 1967; Rhodes und Chamberlin, 1974). Auch kann an T4 DNA der Vorgang der Termination und der anschließenden Reinitiation nur bei hoher Ionenstärke erfolgen (Maitra et al., 197O; vgl. auch Ergebnisse, Kap. I.1).

Vergleicht man nun den Einfluß der Ionenstärke auf die Gesamtreaktion der

Bildung langkettiger RNA (Fig. 12b) mit der Wirkung auf die Synthese von DNTP (Fig. 12a), so sieht man, daß der Verlauf der Abhängigkeiten sehr verschieden ist. Jedoch zeigen Messungen von Millette et al. (1970) an T4 DNA, von Chamberlin und Ring (1972) an T7 DNA und Miller und Burgess (1978b) an λb2 DNA als Matrize, daß der Teilprozeß der Initiation der RNA-Synthese durch die Ionenstärke in ähnlicher Weise wie die DNTP-Bildung beeinflußt wird. So laufen beide Reaktionen bei niedriger Ionenstärke optimal ab. Im Gegensatz dazu führt die Erhöhung der Salzkonzentration zu einer Reduktion des Reaktionsablaufs.

Diese Übereinstimmung ist ein direkter Hinweis darauf, daß die Reaktionsschritte der DNTP-Synthese und der Initiation langer RNA-Ketten identisch sind und somit auf gleiche Weise katalysiert werden.

Zusammenfassend ergibt sich, daß Rifampicin unabhängig von der Wahl der Reaktionsparameter die Bildung von DNTP nur wenig beeinflußt. Unterschiede in den Bildungsraten können im wesentlichen auf die Blockierung der in Abwesenheit des Hemmstoffs möglichen RNA-Restsynthesen (vgl. Ergebnisse, Kap. I.4, Anm. 5) zurückgeführt werden. Dies bedeutet aber, daß die beobachtete geringe Wirkung von Rifampicin auf das Ausmaß der DNTP-Synthese nicht in der Wahl der Reaktionsparameter begründet ist, sondern eine allgemeine Eigenschaft des Antibiotikums darstellt.

Darüber hinaus weist die Übereinstimmung der Abhängigkeiten der DNTP-Bildung und der RNA-Initiationsreaktion von allen drei Reaktionsparametern darauf hin, daß die beiden Prozesse bis zur Abdissoziation des gebildeten DNTP identisch sind und somit wohl auch durch das gleiche aktive Zentrum der RNA Polymerase katalysiert werden.

III. Identität der Katalyse der Bildung von DNTP bei der abortiven Initiation und der Initiation langkettiger RNA

Der identische Einfluß der Reaktionsparameter Temperatur, Protonenkonzentration und Ionenstärke auf die Bildung von DNTP und die Initiationsreaktion der RNA-Synthese legt nahe, daß beide Prozesse durch die RNA Polymerase auf gleiche Weise katalysiert werden.

Nun fanden aber mehrere Autoren bei der Untersuchung des Mechanismus dieser beiden Reaktionen (Rhodes und Chamberlin, 1975; Smagowitz und Scheit, 1977; McClure et al., 1978), daß die Bindungsaffinität der Anlagerung des zweiten Ribonucleosidtriphosphats an den Enzym-DNA-Komplex bei beiden Reaktionen größer ist als die des ersten Ribonucleotids. Jedoch unterscheiden sich die vorgeschlagenen Reaktionsabläufe beider Reaktionen in der Reihenfolge der Substratanlagerung. Dies schien darauf hinzuweisen, daß die Bildung von DNTP und RNA durch verschiedene aktive Zentren der RNA Polymerase katalysiert wird [9]. Man muß jedoch festhalten, daß diese differierenden Ergebnisse durch prinzipiell verschiedene Analyseverfahren erhalten wurden.

So untersuchten McClure et al. (1978) den Mechanismus der DNTP-Synthese mit Hilfe der klassischen "steady state" Methode. Die Analyse der Bildung von DNTP ergab, daß die Daten mit einem Mechanismus einer geordneten Substratanlagerung übereinstimmten, bei der das initiierende Ribonucleosidtriphosphat ATP zuerst gebunden wird.

Smagowicz und Scheit (1977) kamen zu demselben Ergebnis, wobei diese Auto-

---

9) Diese Vorstellung ist auf Grund der Größe der RNA Polymerase und der Verschiedenartigkeit der Untereinheiten durchaus denkbar (Zillig et al., 1976). Auch ist bei der RNA Polymerase der Phagen T3 und T7 schon eine einzige Untereinheit zur Katalyse von RNA befähigt (Dunn et al., 1971; Chamberlin et al., 1970). Andererseits erscheint es nicht plausibel, daß bei der Katalyse von DNTP und RNA durch zwei verschiedene aktive Zentren das Ausmaß der Produktbildung umgekehrt proportional aneinander gekoppelt ist (vgl. Ergebnisse, Kap. I.1). Diese Abhängigkeit kann jedoch zwanglos erklärt werden, wenn ein oder mehrere Elementarschritte der beiden Reaktionen identisch sind, da dadurch die Bildung eines Reaktionsprodukts die gleichzeitige Bildung des anderen ausschließt.

ren jedoch die DNTP-Synthese in Gegenwart von Rifampicin untersuchten, ohne den Einfluß des Antibiotikums auf die Bildungsgeschwindigkeit der DNTP-Synthese zu klären.

Rhodes und Chamberlin (1975) analysierten die Reihenfolge der Substratanlagerung mit der von Rose et al. (1974) beschriebenen "isotope trapping" Methode [10]. Die Ergebnisse der Analyse der Initiationsreaktion mit Hilfe dieser indirekten Methode wurden in der Weise gedeutet, daß zunächst das zweite Ribonucleosidtriphosphat sehr rasch mit dem Enzym-DNA-Komplex assoziiert, während das initiierende, erste Ribonucleosidtriphosphat erst danach in einer langsameren, geschwindigkeitsbestimmenden Folgereaktion gebunden wird. Jedoch konnte die entgegengesetzte Reihenfolge der Substratanlagerung nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Auf Grund dieser differierenden vorgeschlagenen Mechanismen der Substratanlagerung stellte sich daher die Frage, ob die Katalyse der DNTP-Bildung und der Initiation der RNA-Synthese trotzdem identisch sind, und die Unterschiede in den postulierten Mechanismen somit in der Verschiedenartigkeit der Analyseverfahren begründet sind, oder ob die beiden Reaktionsabläufe nur formal identisch sind, mechanistisch aber von verschiedenen Bereichen der RNA Polymerase katalysiert werden.

Zur Klärung dieser Frage wurde untersucht, welcher Reaktionsschritt für die starke Temperaturabhängigkeit der DNTP-Synthese (vgl. Ergebnisse, Kap. II.1) verantwortlich ist und somit das Ausmaß dieser Reaktion bestimmt.

---

10) Während bei der "steady state" Analyse die Veränderung des zeitlichen Verlaufs der Produktbildung bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt wird, werden die kinetischen Parameter der Produktbildung bei diesem Verfahren dadurch ermittelt, daß das Ausmaß der Reaktion in Abhängigkeit sowohl des Substrats als auch eines kompetitiv zur Substratanlagerung irreversibel bindenden Inhibitors bestimmt wird. Da jedoch das eigentliche Reaktionsprodukt des Initiationsvorgangs der RNA-Synthese, das DNTP, unter den gegebenen Bedingungen nicht faßbar war, wurde nur indirekt aus der RNA-Bildung auf die Initiation geschlossen. Außerdem wurde von der Voraussetzung ausgegangen, daß Rifampicin in einer zur Initiation parallelen Reaktion ausschließlich den Initiationskomplex vor der Bindung der Substrate inaktiviert (vgl. Mangel und Chamberlin, 1974). Dies kann jedoch schon auf Grund der Synthese von DNTP durch die Verknüpfung der initiierenden Substrate ATP und UTP trotz Anwesenheit des Hemmstoffs in der strengen Form nicht zutreffen.

Da Rifampicin die Bildung von DNTP nur wenig beeinflußt, die störende parallele RNA-Synthese jedoch durch den Hemmstoff fast vollständig inhibiert ist, wurden die folgenden Untersuchungen in Gegenwart des Antibiotikums durchgeführt.

1. Einfluß der Untereinheit Sigma

Sowohl die Katalyse von RNA als auch von DNTP wird an doppelsträngiger, nativer Phagen DNA als Matrize durch die Anwesenheit von Sigma drastisch stimuliert (Burgess et al., 1969; Johnston und McClure, 1976; vgl. Anm. 11). Die Steigerung der RNA-Synthese kommt dadurch zustande, daß an diesen spezifischen Matrizen nur RNA Polymerase Holoenzym eine begrenzte Anzahl stabiler Enzym-DNA-Komplexe bilden kann (Müller, 1971; Hinkle und Chamberlin, 1972), die bei der RNA-Synthese spezifisch initiieren können (Bautz et al., 1969).

Nun wurde vermutet, daß Sigma auf die eigentliche Verknüpfung der Ribonucleosidtriphosphate keinen Einfluß hat. So deutet die Analyse des Reaktionsgemischs durch Polyacrylamidgele darauf hin, daß Sigma nach Beginn der RNA-Synthese vom ternären Komplex aus E. coli RNA Polymerase-T4 DNA-RNA abdissoziiert (Ruet et al., 1970). Travers und Burgess (1969) schlugen vor, daß an T4 DNA die freigesetzte Untereinheit Sigma erneut die Initiation von RNA durch nachträglich zugegebenes RNA Polymerase Coreenzym stimulieren kann.

Es erhob sich nun die Frage, ob auch bei der DNTP-Synthese ein Kreislauf der Untereinheit Sigma existiert. Da auch die Bildung dieses Katalyseproduktes an T4 DNA als Matrize sigmaabhängig ist (vgl. Anm. 11), ist es durchaus vorstellbar, daß der spezifische Praeinitiationskomplex zwischen Holoenzym und Matrize vor jeder Bildung eines weiteren DNTP-Moleküls immer wieder neu entstehen muß.
Da Zillig et al., (1970) zeigen konnten, daß bei der RNA-Synthese die Bildung des spezifischen Präeinitiationskomplexes stark von der Temperatur beeinflußt wird, könnte die permanente Neubildung des spezifischen Praeinitiationskomplexes die Ursache der starken Temperaturabhängigkeit der DNTP-Synthese darstellen. Daher wurde untersucht, ob während der Bildung von DNTP in Anwesenheit von Rifampicin aktives freies Sigma auftritt, das vor der Bildung eines weiteren DNTP-Moleküls erst wieder neu an den Komplex zwischen Enzym und DNA binden und somit einen zyklischen Kreisprozeß durchlaufen müßte. Dies hätte aber zur Folge, daß man diese aktive, kurzzeitig in freier Form

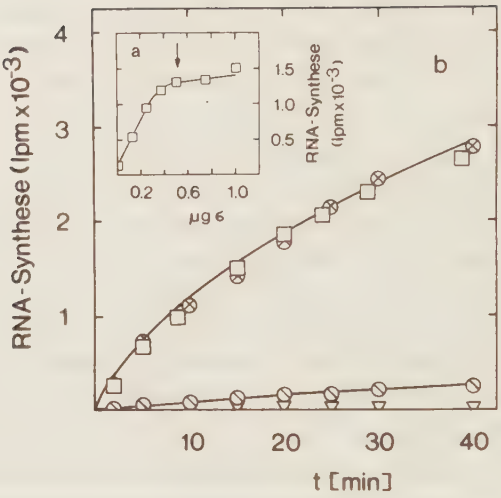


Fig. 13 Stimulation von RNA Polymerase Coreenzym mit Sigma an T4 DNA

a. Abhängigkeit der Stimulation von der Sigma-Konzentration

Zu je 1,3 µg resistentem RNA Polymerase Coreenzym wurden unter Standardbedingungen der RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) in der Salzmischung A mit den auf der Abszisse angegebenen Mengen an Sigma (0 bis 2,0 µg) und je 15,0 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 50 µl). Diese Lösung wurde für 10 min bei 25°C inkubiert. Der Start der RNA-Synthese bei 25°C erfolgte jeweils durch Zugabe von 50 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP,GTP,CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Nach 15 min wurde je 25 µl der Reaktionslösung entnommen, und der Einbau von [^{14}C]UMP in RNA (□) bestimmt.

b. Zeitlicher Verlauf der Stimulation der RNA-Synthese

In vier parallelen Ansätzen wurden unter Standardbedingungen der RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) entweder 5,1 µg RNA Polymerase Holoenzym, 3,9 µg resistentes RNA Polymerase Coreenzym, 1,6 µg Sigma oder eine Mischung aus 3,9 µg resistentem RNA Polymerase Coreenzym und 1,65 µg Sigma in der Salzmischung A mit jeweils 45,0 µg T4 DNA versetzt (result. Vol. je 150 µl). Diese Lösungen wurden jeweils für 10 min bei 25°C inkubiert. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte jeweils durch Zugabe von 150 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP,GTP,CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurden je 25 µl entnommen, und der Einbau von [^{14}C]UMP in RNA durch Holoenzym (□), resistentes Coreenzym und Sigma (⊗), resistentes Coreenzym (⊘) oder Sigma (▽) bestimmt.

auftretende katalytische Untereinheit Sigma durch nachträglich zugegebenes rifampicinresistentes RNA Polymerase Coreenzym abfangen können sollte.

Dieses Coreenzym, das vollständig resistent gegenüber der Wirkung von Rifampicin ist (vgl. Material, Kap. 2a), kann die Synthese von RNA an T4 DNA als Matrize in Abwesenheit der Untereinheit Sigma nur wenig katalysieren (Fig. 13a). Erst die Zugabe von steigenden Mengen an isoliertem Sigma stimuliert die RNA-Synthese, So erhöht die 1,35molare Menge die Aktivität des resistenten Coreenzyms maximal auf etwa das siebzehnfache. Da das isolierte Sigma keine Eigenaktivität besitzt (Fig. 13b), ist die Stimulation auf die Bildung von Holoenzym zurückzuführen. Die etwas zu große molare Menge an Sigma, die zur optimalen Stimulation notwendig ist, ist wahrscheinlich auf inaktives Sigma zurückzuführen, da diese Untereinheit sehr labil gegenüber der Wirkung von Proteasen ist (Lill, 1973). Diese gesteigerte Bildungsrate des resistenten Coreenzyms in Anwesenheit von Sigma entspricht der Syntheserate der äquimolaren Menge an sensitivem RNA Polymerase Holoenzym (Fig. 13b).

Das Ausmaß der Stimulation der RNA-Bildung ist somit ein Maß für das Auftreten von freiem Sigma. Falls nun während der DNTP-Synthese mit Rifampicin Sigma permanent vom Enzym-DNA-Komplex in aktiver Form abdissoziiert, sollte dieses freie Sigma die RNA-Synthese durch nachträglich zugegebenes rifampicinresistentes Coreenzym stark erhöhen.

Inkubiert man sensitives RNA Polymerase Holoenzym mit Rifampicin und anschließend mit T4 DNA, so kann nach Zugabe aller vier Ribonucleosidtriphosphate die kontinuierliche Bildung von DNTP beobachtet werden (Fig. 14a). Durch diese laufende DNTP-Synthese wird die Aktivität von nachträglich in äquimolarer Menge zugesetztem resistentem Coreenzym nur sehr wenig stimuliert (Fig. 14b). Dementsprechend wird auch die Bildung von DNTP durch die Zugabe des resistenten Coreenzyms nur sehr wenig beeinflußt (Fig. 14a). Die nur geringe Stimulation der RNA-Synthese kann auch durch die Erhöhung der Konzentration des eingesetzten resistenten Coreenzyms auf das zweieinhalbfache nur sehr wenig mehr gesteigert werden (ohne Beleg).

Die RNA-Syntheserate kann jedoch sehr stark stimuliert werden, wenn man dem Inkubationsansatz vor der Zugabe des resistenten Coreenzyms die in Fig. 13a festgelegte Menge an isoliertem Sigma hinzufügt (Fig. 14b). Die DNTP-Bildungsrate wird durch die erhöhte RNA-Synthese nur wenig beeinflußt (Fig. 14a).

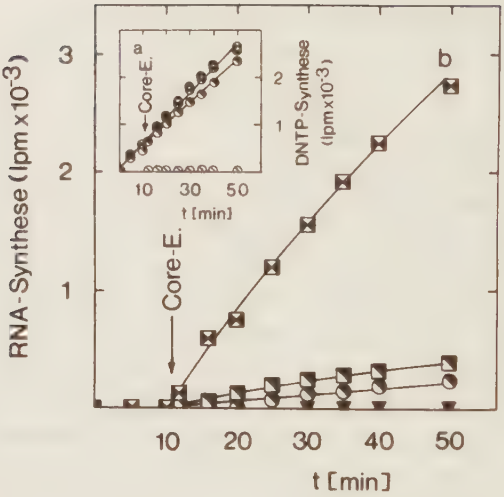


Fig. 14 Stimulation von resistentem RNA Polymerase Coreenzym während der DNTP-Synthese

In zwei von fünf parallelen Ansätzen (Ansatz 1,2) wurde unter Standardbedingungen der RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) je 5,1 µg RNA Polymerase Holoenzym, in zwei weitere Ansätze (Ansatz 3,4) entweder eine Mischung aus 5,1 µg RNA Polymerase Holoenzym und 1,6 µg Sigma oder nur 1,6 µg Sigma jeweils in der Salzmischung A in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Im fünften Ansatz wurde die Enzymlösung durch das entsprechende Volumen an 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C ersetzt. Danach wurde in alle fünf Ansätze 45,0 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 145µl), und die Inkubation für weitere 10 min bei 25 °C fortgesetzt. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte durch Zugabe von je 150 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Nach der weiteren Inkubation für 10 min bei 25°C wurden die Ansätze 2,3 und 5, die entweder nur Holoenzym, die Mischung aus Holoenzym und Sigma oder keinerlei Enzym enthielten, mit je 5 µl einer Lösung, die 4,2 µg resistentes RNA Polymerase Coreenzym (vgl. Material, Kap. 2a, Fig. Ib) enthielt, versetzt. In die Ansätze 1 und 4, die entweder nur Holoenzym oder nur Sigma enthielten, wurde ebenfalls nach 10 min je 5 ul 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,9/25°C gegeben. Zu den in Fig. 15 a,b angegebenen Zeiten wurden je 25 µl aus den verschiedenen Reaktionsmischungen entnommen und der jeweilige Einbau von [^{14}C]UMP in DNTP (Fig. 14a) und RNA (Fig. 14b) bestimmt. DNTP- und RNA-Synthese durch Holoenzym (●,■), Holoenzym und resistentes Coreenzym (◔,◪), Holoenzym, Sigma und resistentes Coreenzym (◕,◩), Sigma (▼) oder resistentes Coreenzym (⊘,◔).

Die deutliche Steigerung der Aktivität des resistenten Enzyms zeigt, daß sich unter den vorgegebenen Inkubationsbedingungen in der Reaktionslösung vorhandenes freies aktives Sigma an das resistente Coreenzym anlagern kann. Weiterhin ergibt sich, daß das DNTP-synthetisierende sensitive Holoenzym die RNA-Synthese durch das so entstandene resistente Holoenzym nicht verhindert. Dies erscheint auf Grund der kleinen eingesetzten Konzentration an sensitivem RNA Polymerase Holoenzym durchaus plausibel (vgl. Ergebnisse, Kap. III.2a).

Somit zeigt die nur geringe Stimulation der RNA-Synthese durch resistentes RNA Polymerase Coreenzym in Abwesenheit von exogen zugesetztem isoliertem Sigma, daß bei der Bildung von DNTP die Untereinheit intermediär nicht in aktiver Form freigesetzt wird. Dieser Befund legt aber nahe, daß während der DNTP-Synthese ein cyklischer Kreisprozeß, bei dem die Untereinheit Sigma nach jeder Synthese eines DNTP-Moleküls kurzzeitig in aktiver Form als freie Untereinheit vorliegt, sich aber vor der Katalyse eines weiteren DNTP-Moleküls wiederum mit dem Coreenzym zum binären Praeinitiationskomplex verbindet, nicht existieren kann [11].

---

11) Nun ist es aber durchaus denkbar, daß die Untereinheit Sigma während der eigentlichen DNTP-Bildung in inaktiver Form irreversibel freigesetzt wird. Zwar läuft die Bildung von DNTP an stark sigmaabhängigen Matrizen wie T4 DNA (Burgess et al., 1969) analog zur RNA-Bildung (Einsatz von Fig. 15a, siehe nächste Seite) durch RNA Polymerase Holoenzym etwa zwanzigfach schneller als durch die äquvalente Menge Coreenzym ab (Fig. 15a), jedoch zeigt die nahezu identische Syntheserate an Lachssperma DNA durch äquivalente Mengen Core- und Holoenzym (Fig. 15b) in Analogie zur RNA-Bildung (Einschub von Fig. 15b), daß die eigentlichen Reaktionsschritte der DNTP-Bildung nicht sigmaabhängig sind.
So besteht bei der Bildung von Dinucleosidtetraphosphat an T4 als Matrize prinzipiell die Möglichkeit, daß die Untereinheit Sigma nur während der Bildung des stabilen Praeinitiationskomplexes an die RNA Polymerase gebunden sein muß, während sie bei der anschließenden eigentlichen katalytischen Reaktion in inaktiver Form irreversibel freigesetzt wird.
Es konnte aber durch die Analyse des Reaktionsgemischs während der DNTP-Synthese durch den Komplex aus E. coli RNA Polymerase Holoenzym und T4 DNA mit Hilfe von Polyacrylamidgelen gezeigt werden, daß die Untereinheit Sigma während der Bildung von DNTP nicht in freier Form vorliegt (S. Lechner, Dissertation). Dies schließt aus, daß während der DNTP-Synthese eine irreversible Freisetzung der Untereinheit Sigma stattfindet. Dies ist in Einklang mit Befunden von Wu et al. (1975). Diese Autoren fanden mit (Forts. S. 71)

Somit kann die starke Temperaturabhängigkeit der Synthese von DNTP nicht auf einen Kreislauf der Untereinheit Sigma und somit auf die permanente Neu-

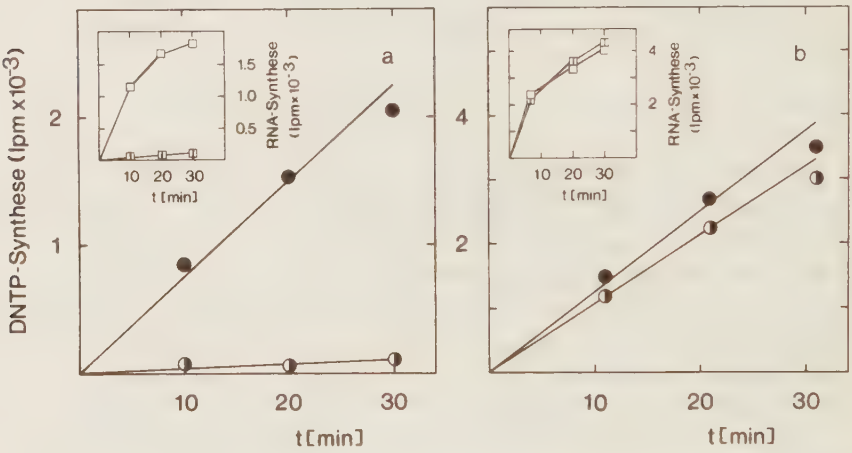


Fig. 15 Vergleich der RNA- und DNTP-Synthese durch RNA Polymerase Holo- und Coreenzym an T4 und Lachssperma DNA

a. T4 DNA

1. RNA-Synthese

In zwei parallelen Ansätzen wurden unter Standardbedingungen der RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) 1,7 µg RNA Polymerase Holoenzym oder 1,3 µg RNA Polymerase Coreenzym jeweils in der Salzmischung A mit je 15,0 µg T4 DNA versetzt (result. Vol. je 50 µl). Diese Lösungen wurden für 10 min bei 25°C inkubiert. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte durch Zugabe von 50 µl auf 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Zu den im Einschub angegebenen Zeiten wurde je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen, und der Einbau von [^{14}C]UMP in RNA durch Holo (□)- oder Coreenzym (▨) bestimmt.

2. DNTP-Synthese

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen von Fig. 15.a.1 mit dem Unterschied identisch, das das freie Holo- oder Coreenzym vor der Zugabe der T4 DNA in der Salzlösung A in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin vorinkubiert wurde.
DNTP-Synthese durch Holoemzym (●), Coreenzym (◑)

bildung des spezifischen Praeinitiationskomplexees durch die wiederholte Anlagerung von Sigma an Coreenzym zurückgeführt werden.

2. Stabilität des Enzym-DNA-Komplexes während der DNTP-Synthese

Da die ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der DNTP-Synthese nicht auf einen Kreislauf der Untereinheit Sigma zurückgeführt werden konnte, erhob sich die Frage, ob der Einfluß der Temperatur darin begründet ist, daß mit der Dissoziation des gebildeten DNTP-Produkts die gleichzeitige Ablösung des Enzyms von der Matrize verbunden ist. Dies hätte zur Folge, daß nach jeder Synthese eines DNTP-Moleküls freies Enzym entsteht. Da nun DNTP über einen längeren Zeitraum kontinuierlich gebildet wird (vgl. Ergebnisse, Kap. I.1), müßte dieses freie Enzym immer wieder neu an die Matrize binden. Die Bildung des spezifischen Praeinitiationskomplexes wird aber von der Temperatur sehr stark beeinflußt (Zillig et al., 1970). Somit könnte die starke Temperaturabhängigkeit der DNTP-Synthese durch diesen permanenten Wechsel zwischen Zerfall und Neubildung des Enzym-DNA-Komplexes, der die Bildung von DNTP katalysieren kann, verursacht werden.

2a. Blockierung der Matrize durch den Rifampicin- RNA Polymerase-Komplex

Falls das Enzym bei der rifampicininduzierten Synthese von DNTP auch bei der

---

b. Lachssperma DNA

1. RNA-Synthese

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen von Fig. 15. a.1 mit dem Unterschied identisch, daß 17,8 µg RNA Polymerase Holoenzym bzw. 14,0 µg RNA Polymerase Coreenzym eingesetzt, und die 15,0 µg T4 DNA durch 52,0 µg Lachssperma DNA ersetzt wurde.
RNA-Synthese durch Holoenzym (□), Coreenzym (▥)

2. DNTP-Synthese

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen von Fig. 15.b.1 mit dem Unterschied identisch, daß das freie Holo- oder Coreenzym vor der Zugabe der Lachssperma DNA in der Substratlösung A vorinkubiert wurde, die 40 µg/ml Rifampicin enthielt.
DNTP-Synthese durch Holoenzym (●), Coreenzym (◑)

(Forts. von S. 69) Hilfe der Fluororeszens-Depolarisationsspektroskopie ebenfalls, daß an T7 DNA unter Bedingungen, bei denen die DNTP-Synthese möglich ist, die Untereinheit Sigma nicht freigesetzt wird.

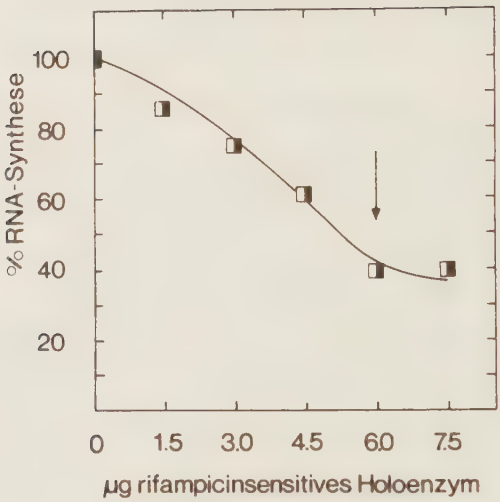


Fig. 16 Abhängigkeit der Blockierung der RNA-Synthese durch resistente RNA Polymerase von der Konzentration des Rifampicin-RNA Polymerase-Komplexes

Zu den auf der Abszisse angegebenen Mengen sensitivem RNA Polymerase Holoenzym wurde unter den Standardbedingungen der RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) in der Salzmischung A jeweils 15,0 µg T4 DNA gegeben (result. Vol. je 50 µl). Diese Lösungen wurden für 10 min bei 25°C inkubiert. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte durch Zugabe von 50 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) und zusätzlich 6 µg resistentes RNA Polymerase Holoenzym enthielt. Nach 15 min wurde je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen, der jeweilige Einbau von [^{14}C]UMP in RNA (◨) bestimmt und auf die RNA-Synthese in Abwesenheit von sensitivem Holoenzym bezogen (100 % = 4048 Ipm). ———►: Testkonzentration

Produktablösung an die Matrize gebunden bleibt, sollte die gleichzeitige Bildung von RNA dauerhaft blockiert sein.

Nun konnten sowohl Bordier (1974) als auch Hayward (1976) zeigen, daß der Rifampicin-RNA Polymerase-Komplex bei niedriger Ionenstärke die Transkription von T7 DNA durch rifampicinresistente Enzymmoleküle inhibieren kann.

Auch Axelrod (1976) und Kassavetis et al. (1978) beobachteten diese Blockierung der Matrize in der Weise, daß nachträglich zugegebene Rifampicin - RNA Polymerase - Komplexe den frühzeitigen Abbruch der Synthese schon begonnener RNA-Ketten spezifisch an distalen Promotorbereichen erzwingen. Dieser frühzeitige Abbruch der RNA-Synthese kommt auch schon beim Hinzufügen allein von Rifampicin zur laufenden RNA-Synthese zum Ausdruck (Minkley und Pribnow, 1973).

Es wurde aber bisher nicht geklärt, ob diese Blockierung der RNA-Synthese mit der Bildung von DNTP in direktem Zusammenhang steht. Da die Katalyse von DNTP jedoch matrizenabhängig abläuft (vgl. Methoden, Kap. 1d, Fig. II), war zu vermuten, daß die rifampicininduzierte DNTP-Synthese durch RNA Polymerase den Grund für die Inhibierung der Transkription der Matrize in Ribonucleinsäure darstellt.

Nun sollte die Blockierung der RNA-Synthese der rifampicinresistenten RNA Polymerase durch sensitive RNA Polymerase in Gegenwart des Antibiotikums um so ausgeprägter sein, je höher die Konzentration an sensitivem Enzym ist. Fig. 16 zeigt, daß die optimale RNA-Synthese an T4 DNA, die bei der DNA-Konzentration von 150 µg/ml bei einer Konzentration der resistenten RNA Polymerase von 60 µg/ml erreicht wird (vgl. Kessler, 1976), durch steigende Mengen sensitiver RNA-Polymerase, die mit Rifampicin vorinkubiert wurde, zunehmend gehemmt wird. Bei einem Molverhältnis von 1:1 ist die Inhibierung am ausgeprägtesten und beträgt etwa 65 %. Auch durch die weitere Steigerung der Konzentration des sensitiven Enzyms läßt sich die RNA-Synthese nicht vollständig hemmen. Diese restliche Aktivität wurde auch, wenn auch in etwas geringerem Umfang, von Bordier (1974) und Hayward (1976) an T7 DNA als Matrize beobachtet. Da der Rifampicin - RNA Polymerase-Komplex nur die Bildung der spezifischen, nicht aber der unspezifischen Transkriptionsprodukte verhindert (Bordier, 1974), ist die unvollständige Inhibierung wohl auf die Initiation langer RNA-Ketten an DNA-Bindungsstellen schwacher Affinität zurückzuführen. Zur Blockierung der RNA-Synthese wurde daher in den folgenden Experimenten eine Konzentration an sensitiver RNA Polymerase von 60 µg/ml eingesetzt.

Inkubiert man bei niedriger Ionenstärke sensitive RNA Polymerase mit Rifampicin und anschließend mit T4 DNA, so wird nach Zugabe aller vier Ribonucleosidtriphosphate kontinuierlich DNTP gebildet (Fig. 17a). Diese DNTP-Bil-

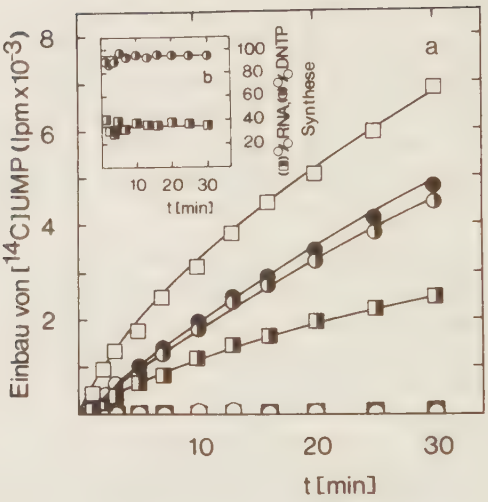


Fig. 17 Zeitlicher Verlauf der Blockierung der RNA-Synthese

In drei parallelen Ansätzen wurde unter Standardbedingungen der RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) in die ersten beiden Ansätze je 18.0 µg sensitives RNA Polymerase Holoenzym, in den dritten das entsprechende Volumen 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C in der Salzmischung A in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Danach wurde je 45,0 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 150 µl), und die Inkubation für weitere 10 min bei 25°C fortgesetzt. Der Start der Reaktion erfolgte in allen drei Ansätzen durch Zugabe von je 150 µl einer bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen und je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) im zweiten und dritten Ansatz zusätzlich 18,0 µg resistentes RNA Polymerase Holoenzym enthielt. Zu den auf der Abszisse von Fig. 18a angegebenen Zeiten wurde je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen, und der Einbau von [^{14}C]UMP in RNA und DNTP bestimmt.

sensitives Holoenzym: RNA (■)-, DNTP (●)-Synthese

resistentes Holoenzym: RNA (□)-, DNTP (○)-Synthese

sensitives und resistentes Holoenzym: RNA (◨)-, DNTP (◑)'Synthese

In Fig. 18b wurde das jeweilige Verhältnis der RNA-Synthese durch das resistente Holoenzym in An- und Abwesenheit des sensitiven Holoenzyms (◨) und der DNTP-Synthese durch das sensitive Holoenzym in An- und Abwesenheit des resistenten Holoenzyms (◑) als Funktion der Reaktionsdauer dargestellt.

dung wird nur wenig reduziert, wenn man zu dem Rifampicin-Enzym-DNA-Komplex gleichzeitig mit dem Substrat resistente RNA Polymerase hinzufügt. Jedoch wird unter diesen Bedingungen das Ausmaß der RNA-Synthese, die durch das resistente Enzym katalysiert wird, um etwa 65 % reduziert (Fig. 17b). Diese Inhibierung wird während der gesamten Inkubationsdauer beobachtet.

Der Rifampicin-RNA Polymerase-Komplex blockiert also während der DNTP-Synthese dauerhaft einen großen Teil der Transkription langer RNA-Ketten. Umgekehrt hat jedoch nachträglich zugefügte resistente RNA Polymerase auf die DNTP-Syntheserate nur einen sehr geringen Einfluß. Dies bedeutet aber, daß bei niedriger Ionenstärke der Komplex zwischen Enzym und DNA stabil ist. Somit muß man folgern, daß unter diesen Inkubationsbedingungen das Enzym während der Bildung von DNTP an die Matrize gebunden bleibt [12].

2b. Heparin-Sensitivität der DNTP-Synthese

Die Analyse der Blockierung der RNA-Synthese durch den Rifampicin-RNA Polymerase-Komplex zeigte, daß das Enzym bei niedriger Ionenstärke während der Bildung von DNTP nicht von der DNA abdissoziiert. Diese Stabilität des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes während der DNTP-Synthese läßt sich zusätzlich durch die Analyse der Wirkung des Hemmstoffs Heparin auf die Bildung von DNTP verdeutlichen.

Walter et al. (1967) fanden, daß dieses Mucopolysaccharid freie RNA Polymerase schon bei niedrigen Konzentrationen hemmt. Auch Enzymmoleküle, die unspezifisch an doppelsträngige DNA gebunden sind, werden ebenfalls rasch durch den Hemmstoff inaktiviert (Zillig et al., 1970).

Im Gegensatz dazu ist jedoch die Desaktivierungsgeschwindigkeit der spezifi-

---

12) Demgegenüber tritt bei hoher Ionenstärke diese dauerhafte Blockierung nicht auf. Vielmehr nimmt in einem analogen Experiment bei 0,2 mol/l KCl die Bildung von DNTP auf etwa 75 % des unbeeinflußten Werts ab, während die Reduktion der RNA-Synthese nur etwa 10 bis 20 % ausmacht (ohne Beleg). Die gegenseitige Beeinflussung der beiden Reaktionen weist darauf hin, daß bei hohen Salzkonzentrationen das Enzym während der DNTP-Synthese von der DNA abdissoziiert. Dies hat zur Folge, daß unter diesen Bedingungen die Matrize der Transkription zugänglich wird.

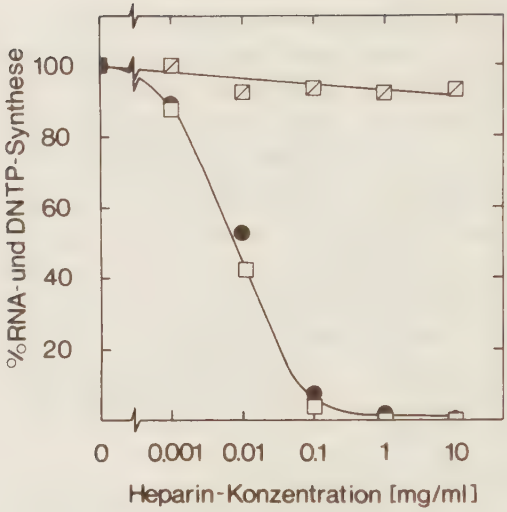


Fig. 18 Dosis-Wirkungs-Kurve des Heparins

a. Wirkung auf freie RNA Polymerase und den Rifampicin-RNA Polymerase-Komplex

Je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym wurde unter Standardbedingungen der RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) in der Salzmischung A in Ab- und Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde 0 bis 4 µg Heparin (vgl. Material, Kap. 5) zugegeben (result. Vol. je 40 µl), so daß die Vorinkubationslösungen die jeweils auf der Abszisse angegebenen Heparinkonzentrationen enthielten. Nach einer weiteren Inkubation für 5 sec bei 25°C wurde die Reaktion bei 25°C durch Zugabe von 60 µl Substratlösung gestartet, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) zusätzlich je 15,0 µg T4 DNA enthielt. Der jeweils in 25 µl Reaktionsmischung innerhalb von 10 min beobachtete Einbau von [^{14}C]UMP in RNA (□) oder DNTP (●) wurde auf die RNA- bzw. DNTP-Synthese in Abwesenheit von Rifampicin bezogen. (100 % - Wert der RNA-Synthese = 1153 Ipm; 100 % - Wert der DNTP-Synthese = 529 Ipm)

b. Wirkung während der RNA-Synthese

Zu je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym wurden unter Standardbedingungen der RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) in der Salzmischung A 15,0 µg T4 DNA gegeben (result. Vol. je 50 µl). Diese Lösung wurde für 10 min bei 25°C inkubiert. Der Start der RNA-Synthese bei 25°C erfolgte durch Zugabe von 40 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Nach der weiteren Inkubation für 1 min bei 25°C wurde in 10 µl

schen Praeinitiationskomplexe zwischen E. coli RNA Polymerase Holoenzym und der Matrize stark reduziert (Schäfer et al., 1973). Auch der ternäre Elongationskomplex erweist sich gegenüber der Wirkung von Heparin als weitgehend stabil (Fuchs et al., 1967).

Nun wird die Anlagerung von Heparin an E. coli RNA Polymerase durch Rifampicin nicht verhindert (Lill et al., 1970; Neuhoff et al., 1970) [13]. Somit ist eine zunehmende Inaktivierung des Enzym-DNA-Komplexes während der DNTP-Synthese durch Heparin auch in Anwesenheit von Rifampicin ein direktes Maß für das zwischenzeitliche Auftreten von freier oder nur unspezifisch an die Matrize gebundene RNA Polymerase.

Um zu erfahren, ob während der DNTP-Synthese an T4 DNA zwischenzeitlich freies oder nur unspezifisch gebundenes Enzym auftritt, wurde daher zunächst der Einfluß von Heparin auf die DNTP-Synthese in Anwesenheit von Rifampicin bei 25°C untersucht. Dabei wurde eine Heparinkonzentration von 100 µg/ml gewählt, da bei dieser Konzentration der freie Rifampicin- Enzym-Komplex in weniger als 5 Sekunden zu mehr als 90 % inaktiviert wird (Fig. 18a). Diese Heparinkonzentration hemmt auch in Abwesenheit von Rifampicin in weniger als 5 Sekunden zu über 90 % (Fig. 18a). Im Gegensatz dazu wird unter diesen Bedingungen die Aktivität des ternären Elongationskomplex nur um etwa 5 % reduziert (Fig. 18b).

Somit war sichergestellt, daß nur beim zwischenzeitlichen Auftreten von freiem oder nur unspezifisch gebundenem Enzym die DNTP-Synthese durch Heparin zunehmend inaktiviert werden kann.

Analysiert man unter diesen Bedingungen die Wirkung des Polyanions auf das

---

10 µg Heparin zugefügt und jeweils nach der weiteren Inkubation für 2 min bei 25°C je 25 µl entnommen, der Einbau von [^{14}C]UMP in RNA (▨) bestimmt und auf die RNA-Synthese in Abwesenheit von Heparin bezogen (100 % - Wert = 440 Ipm/2 min).

13) Dies ist auch plausibel, da die beiden Hemmstoffe an verschiedene Untereinheiten der E. coli RNA Polymerase binden. So bindet das Polyanion Heparin, wahrscheinlich auf Grund von starken ionischen Wechselwirkungen, an die isolierte Untereinheit β' (Zillig et al., 1970). Dagegen erfolgt die spezifische Bindung von Rifampicin wohl über hydrophobe Wechselwirkungen an die Untereinheit β der E. coli RNA Polymerase im Enzymkomplex (Heil und Zillig, 1970; Lill und Hartmann, 1973; Heumann, 1978).

Ausmaß der laufenden DNTP-Synthese, so stellt man fest, daß schon kurz nach

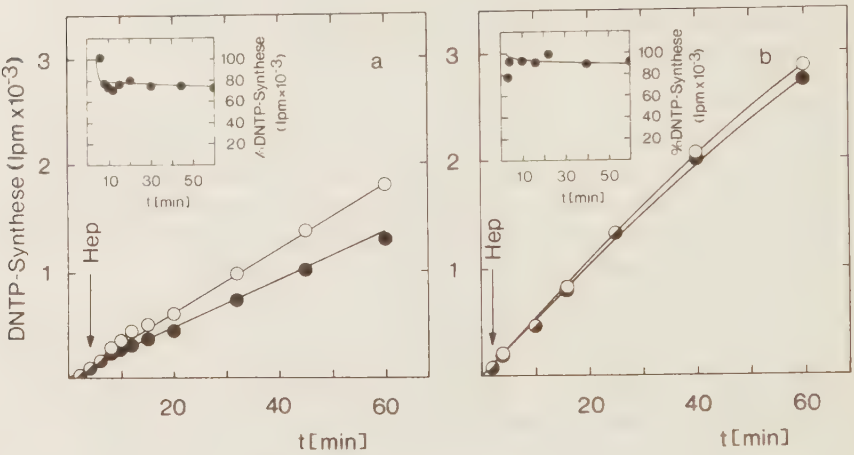


Fig. 19 Einfluß von Heparin auf die DNTP-Synthese

a. Einfluß von Heparin auf die DNTP-Synthese bei 25°C

In zwei parallelen Ansätzen wurde je 6,1 µg RNA Polymerase Holoenzym unter Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1b) in der Salzmischung A, die an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C 50 mmol /l HEPES NaOH-Puffer, pH 7,9/25°C enthielt, in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Danach wurde je 45 µg T4 DNA zugegeben (result Vol. je 145 µl), und die Inkubation für weitere 10 min bei 25°C fortgesetzt. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte durch Zugabe von 150 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Nach der weiteren Inkubation für 4 min bei 25°C wurde einer der beiden Lösungen 5 µl H_2O, der anderen 5 µl 6mg/ml Heparinlösung (= 30µg) zugesetzt, und die Inkubation bei 25°C fortgesetzt. Zu den in Fig. 19a angegebenen Zeiten wurde je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen, und der Einbau von [^{14}C]UMP in DNTP in Ab (○)- und Anwesenheit (●) von Heparin bestimmt. Im Einschub von Fig. 19a wurde das jeweilige Verhältnis der DNTP-Synthese in An- und Abwesenheit von Heparin (●) als Funktion der Reaktionsdauer aufgetragen.

b. Einfluß von Heparin auf die DNTP-Synthese bei 37°C

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen von Fig. 19a mit Ausnahme der Änderungen identisch, daß alle Operationen bei 37°C ausgeführt wurden, und die Zeitdauer der beiden Vorinkubationen 5 min betrug. Außerdem wurde Heparin schon 2 min nach Start der Reaktion zugegeben.

Zugabe des Hemmstoffs die Bildung von DNTP zu etwa 20 % inhibiert wird (Fig. 19a). Der restliche Anteil der DNTP-Synthese von etwa 80 % kann jedoch auch innerhalb einer Stunde nur wenig gehemmt werden. Die Halbwertszeit dieser sehr langsamen Inaktivierung beträgt mehr als 5 Stunden.

Untersucht man die Wirkung von Heparin auf die DNTP-Synthese in Abwesenheit von Rifampicin mit ATP und UTP als Substrat, so ergibt sich ein vollkommen analoges Bild (ohne Beleg). Dies bestätigt, daß Rifampicin die Anlagerung von Heparin nicht verhindert. Andererseits bedeutet dies aber auch, daß darüber hinaus die Stabilität der Enzym-DNA-Komplexe gegenüber der Wirkung von Heparin von Rifampicin nicht beeinflußt wird.

Wird die Temperatur der Inkubationslösung auf 37°C erhöht, so findet man in Übereinstimmung mit den Befunden von Johnston und McClure, (1976), daß der stabile Anteil der DNTP-Bildung über 90 % ausmacht (Fig. 19b). Die Halbwertszeit der sehr langsamen Inaktivierung beträgt auch bei 37°C wiederum mehr als 5 Stunden.

Die nur partielle Hemmung der DNTP-Synthese bei 25 und 37°C weist auf die Koexistenz zweier DNTP-synthetisierender Spezies von Komplexen aus DNA und Holoenzym unterschiedlicher Heparinsensitivität hin. Unter der Annahme, daß sich die Synthesegeschwindigkeiten dieser unterschiedlichen Enzym-DNA-Spezies nicht unterscheiden, entspricht das Ausmaß der nur sehr langsam hemmbaren DNTP-Bildung dem Anteil der Enzym-DNA-Komplexe, die die Synthese von DNTP nahezu unbeeinflußt von der Anwesenheit von Heparin katalysieren können.

Die Tatsache, daß der weitaus größere Anteil der Enzym-DNA-Komplexe während der gesamten Inkubationsdauer durch Heparin nur wenig inhibiert werden kann, verdeutlicht wiederum, daß das Enzym während der DNTP-Synthese fest an die Matrize gebunden bleibt.

Somit zeigen sowohl die dauerhafte Blockierung der RNA-Synthese durch resistente RNA Polymerase (vgl. Ergebnisse, Kap. III. 2a) als auch die Stabilität gegenüber der hemmenden Wirkung von Heparin, daß bei niedriger Ionenstärke der Komplex zwischen RNA Polymerase und der Matrize während der DNTP-Bildung stabil ist.

Daher kann die starke Temperaturabhängigkeit der DNTP-Synthese auch nicht durch den permanenten Wechsel zwischen Zerfall und Neubildung des Enzym-DNA-Komplexes verursacht werden.

3. Analyse des Gleichgewichts zwischen aktiven und inaktiven Zustandsformen des Enzym-DNA-Komplexes

Die vorausgehenden Untersuchungen zeigten, daß die starke Temperaturabhängigkeit der DNTP-Synthese weder durch einen permanenten Kreislauf der Untereinheit Sigma noch durch den Zerfall des Enzym-DNA-Komplexes während der Ablösung des gebildeten DNTP erklärt werden kann. Es stellte sich nun die Frage, ob die starke Abnahme der DNTP-Bildung bei Erniedrigung der Temperatur dadurch verursacht wird, daß unter diesen Bedingungen die Zahl der aktiven, also DNTP synthetisierenden Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe zunehmend geringer wird.

Dies würde bedeuten, daß in diesem Fall das Ausmaß der DNTP-Bildung hauptsächlich durch die Einstellung eines stark temperaturabhängigen Gleichgewichts zwischen aktiven und inaktiven Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes festgelegt wird. Die Existenz eines solchen temperaturabhängigen Gleichgewichts liegt nahe, da auch die Initiation langkettiger RNA in Abwesenheit von Rifampicin durch ein temperaturabhängiges Gleichgewicht zweier Zustandsformen des Praeinitiationskomplexes gesteuert wird (Walter et al., 1967).

Die beiden Zustandsformen dieses Gleichgewichts zwischen der RNA Polymerase und der Matrize sind nun im Fall der RNA-Synthese durch eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Wirkung von Heparin gekennzeichnet (Zillig et al., 1970). Somit ist die Sensitivität gegenüber Heparin ein geeignetes Kriterium, zwischen verschiedenen Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes unterscheiden zu können.

3.1 Temperaturabhängigkeit der Heparinwirkung auf die DNTP-Synthese

Bei der Untersuchung der Wirkung von Heparin auf die DNTP-Synthese wurde beobachtet, daß die Bildung dieses Reaktionsprodukts der RNA Polymerase bei 25 und 37°C durch Heparin teilweise inhibiert werden kann (Fig. 19a und 19b). Da das Ausmaß der Inhibierung zeitlich nahezu konstant war, wurde vermutet, daß die DNTP-Synthese durch zwei Enzym-DNA-Spezies verschiedener Heparinsensitivität katalysiert wird. Dabei war das relative Verhältnis der beiden Spezies bei den beiden untersuchten Temperaturen nicht identisch (Einschub von Fig. 19a und 19b). Um die Temperaturabhängigkeit des relativen Verhältnisses der beiden Enzym-DNA-Spezies genauer charakterisieren zu können, wur-

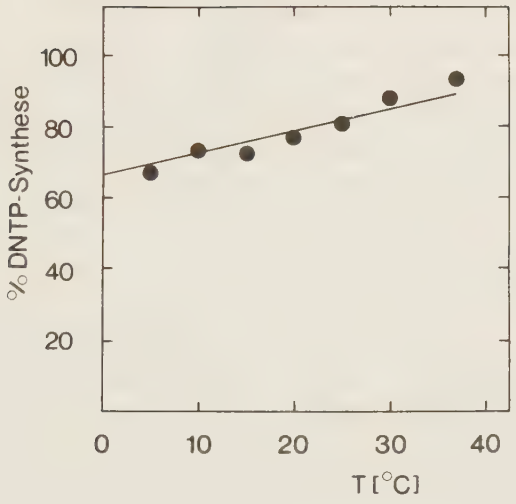


Fig. 20 Temperaturabhängigkeit der Heparinsensitivität der DNTP-Synthese

Die bei den verschiedenen auf der Abszisse angegebenen Temperaturen bestimmte Heparinsensitivität wurde analog Fig. 19a mit den Änderungen durchgeführt, daß einerseits in den Salzmischungen A und B an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH-Puffer, pH 7,9 bei der jeweils angegebenen Temperatur verwendet wurde, andererseits die Zeitdauer bei den Vorinkubationen (5 und 10°C, 30 min; 15°C, 15 min; 20°C, 12,5 min; 25°C, 10 min; 30°C, 7,5 min; 37°C, 5 min) und die Zeitspanne zwischen Start der Reaktion und Heparinzugabe (5°C, 30 min; 10°C, 20 min; 15°, 12,5 min; 20°C, 7,5 min; 25°C, 4 min; 30°C, 3 min; 37°C, 2 min) variiert wurde. Der jeweilige prozentuale Anteil der heparinstabilen DNTP-Synthese (●) wurde bei den verschiedenen Temperaturen jeweils durch graphische Extrapolation der nach längeren Inkubationszeiten beobachteten prozentualen Hemmung der DNTP-Synthese (vgl. Fig. 19a und 19b) auf den Zeitpunkt der Heparinzugeabe ermittelt.

de die Heparinwirkung auf die DNTP-Synthese innerhalb eines großen Temperaturbereichs analysiert (Fig. 20).

Dazu wurde in jeweils zwei parallelen Inkubationsmischungen bei konstanter, jeweils auf der Abszisse angegebenen Temperatur durch das schrittweise Hinzufügen von Rifampicin und T4 DNA zur freien RNA Polymerase der Praeinitiationskomplex gebildet, wobei die Dauer der Vorinkubation des En-

zyms mit Rifampicin, bzw. des Rifampicin-Enzym-Komplexes mit DNA mit der Erniedrigung der Temperatur zunehmend verlängert wurde. Danach erfolgte bei der gleichen Temperatur der Start der DNTP-Synthese durch Zugabe von Substrat. Nachdem die Bildung von DNTP bei der jeweiligen Temperatur bestimmt begonnen hatte, wurde einem der beiden Inkubationsansätze Heparin, dem anderen das entsprechende Volumen H_2O zugesetzt, und die Inkubation ohne Temperaturwechsel fortgesetzt. Wie in Fig. 19a und 19b deutlich zu sehen ist, wird die Hauptmenge des gemessenen DNTP erst nach der Zugabe von Heparin, bzw. H_2O gebildet.

Betrachtet man die bei den verschiedenen Temperaturen erhaltenen Ergebnisse (Fig. 19a, 19b sowie ohne Beleg), so stellt man fest, daß das Ausmaß der DNTP-Bildung durch Heparin bei allen untersuchten Temperaturen jeweils nur um einen relativ geringen Betrag reduziert wird. Der verbleibende Anteil der DNTP-Synthese wird durch den Hemmstoff in allen Fällen, also auch bei tiefen Temperaturen, nur sehr langsam gehemmt. Da der jeweilige heparinstabile Anteil der DNTP-Bildung bei allen untersuchten Temperaturen selbst nach längerer Heparineinwirkung nicht signifikant kleiner als unmittelbar nach der Zugabe des Hemmstoffs ist, kann ausgeschlossen werden, daß der eigentlichen Heparinwirkung zusätzlich eine Temperaturabhängigkeit der Anlagerungsgeschwindigkeit des Polyanions überlagert ist.

Ermittelt man den jeweiligen Anteil der heparinstabilen DNTP-Synthese durch Extrapolation der nach längeren Inkubationszeiten bestimmten prozentualen Hemmung der Bildung von DNTP auf den Zeitpunkt der Heparinzugabe und trägt diesen gegen die Temperatur auf, so zeigt sich, daß dieser Anteil nur wenig von der Temperatur abhängt (Fig. 20). Geht man wiederum davon aus, daß das Verhältnis der heparinstabilen und -labilen DNTP-Synthese den jeweiligen Anteil der stabilen und labilen Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe widerspiegelt (vgl. Ergebnisse, Kap. III, 2b), so bedeutet dies, daß auch das Verhältnis der aktiven, also DNTP synthetisierenden Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe, die durch unterschiedliche Heparinsensitivität gekennzeichnet sind, durch die Temperatur nur wenig beeinflußt wird.

Der Unterschied der Heparinsensitivität der beiden Zustände der aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe kann nicht daher rühren, daß es sich um den Komplex einmal zwischen DNA und Coreenzym, das andere Mal zwischen DNA und Holoenzym handelt, da nur der Holoenzym-DNA-Komplex die Bildung von DNTP an

T4 DNA katalysieren kann (vgl. Ergebnisse, Kap. III.1, Anm. 11, Fig. 15.a.2).

Das Auftreten von Rifampicin- Enzym-DNA-Komplexen unterschiedlicher Heparinsensitivität kann auch nicht durch das von Zillig et al. (1970) und Schäfer et al., (1973) beschriebene Gleichgewicht zwischen verschiedenen Zustandsformen des spezifischen Praeinitiationskomplexes gedeutet werden, da die Einstellung dieses Gleichgewichts stark temperaturabhängig ist.

Vielmehr weist die nur geringe Temperaturabhängigkeit der partiellen Hemmung der DNTP-Synthese (Fig. 20) darauf hin, daß die unterschiedliche Heparinsensitivität auf die Assoziation der RNA Polymerase an Bereiche der T4 DNA mit verschiedener Bindungsaffinität zurückzuführen ist.

Eine Bestätigung dafür geben die Untersuchungen von Pfeffer et al. (1977). Diese Autoren konnten nämlich an T7 DNA als Matrize durch den Vergleich der verschiedenen Transkriptionsprodukte zeigen, daß E. coli RNA Polymerase, die an verschiedene Promotoren gebunden ist, unterschiedlich rasch durch Heparin inaktiviert wird. Da das Ausmaß der Bindung von E. coli RNA Polymerase an diese verschiedenen T7-Promotoren ebenfalls nur sehr wenig von der Temperatur abhängt (Stahl und Chamberlin, 1977), ist anzunehmen, daß die unterschiedliche Heparinsensitivität der DNTP synthetisierenden Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe die Assoziation der RNA Polymerase an verschiedene Bindungsstellen der T4 DNA widerspiegelt[14].

---

14) Da auch an einzelsträngige DNA gebundene RNA Polymerase durch Heparin rasch inaktiviert wird (Walter et al., 1967), ist es möglich, daß der heparinsensitive Anteil der DNTP-Synthese zusätzlich auch auf Enzymmoleküle zurückzuführen ist, die unspezifisch an Einzelstrangbrüche der DNA gebunden sind. Die Existenz solcher "nicks" an T4 DNA ist wegen der Entstehung von Strangbrüchen bei der Präparation eines derart langen DNA-Moleküls mit einem Molekulargewicht von $105 \pm 6 \times 10^6$ Dalton (Schmidt und Hearst, 1969) zu erwarten. Die Inkubationsbedingungen wurden aber derart gewählt, daß die Enzymkonzentration limitierend war (vgl. Methoden, Kap. 1d). McClure et al. (1978) konnten zeigen, daß unter solchen Bedingungen das Ausmaß der DNTP-Synthese durch starke Fragmentierung von λb2 DNA mit Hae III nur unbedeutend gesteigert wird. Weiterhin führt der Nucleaseabbau von λb2 DNA mit pankreatischer DNase I zu einer drastischen Senkung der DNTP-Synthese. Diese beiden Ergebnisse zeigen deutlich, daß die DNTP-Synthese nicht an unspezifischen Bruchstellen oder internen "nicks" der Matrize ablaufen kann. Da jedoch die heparinsensitiven Enzym-DNA-Komplexe die Bildung von DNTP katalysieren können, ist es wenig wahrscheinlich, daß dieser Anteil durch unspezifisch an Bruchstellen oder "nicks" der DNA gebundenes Enzym verursacht wird.

3.2 Aktivierung inaktiver Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes

Da durch die bisherige Analyse der Wirkung von Heparin auf die DNTP-Synthese nur aktive,also DNTP synthetisierende Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe erfaßt wurden, stellte sich die Frage, ob auch Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe existieren, die inaktiv sind, also die Bildung von DNTP nicht katalysieren können.

Nun gibt es sicher Enzymmoleküle, die im Hinblick auf dieTranskription von DNA prinzipiell inaktiv sind (Wiggs et al., 1979). Daher ist es durchaus vorstellbar, daß es auch inaktive Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe gibt, die die Bildung von DNTP selbst unter optimalen Synthesebedingungen nicht katalysieren können. Da aber diese prinzipiell inaktiven Komplexe durch Aktivitätsessungen nicht erfaßbar sind, werden sie bei den weiteren Überlegungen nicht weiter berücksichtigt.

Dies schließt aber nicht aus, daß es Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe gibt, die zwar bei niedriger Temperatur inaktiv sind, bei der Erhöhung der Temperatur jedoch in eine aktive Zustandsform übergehen können. Dies hätte zur Folge, daß die Anzahl der aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe bei der Erhöhung der Temperatur meßbar zunehmen sollte.

3.2a Temperaturabhängigkeit der Aktivierung inaktiver Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes

Der enzymatisch aktive Rifampicin-Enzym-DNA-Komplex ist bei allen untersuchten Temperaturen gegenüber Heparin weitgehend stabil (Fig. 20). Dies muß aber für den hypothetischen, bei tiefen Temperaturen inaktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplex, der bei höheren Temperaturen in den aktiven Komplexzustand übergehen kann, nicht gelten. In diesem Fall würde ein solcher Komplex bei tiefer Temperatur durch Heparinzugabe inaktiviert werden. Gegenüber einem Kontrollversuch, bei dem Heparin erst bei höherer Temperatur zugegeben wird, wäre dann nach Übergang zur höheren Temperatur eine geringere DNTP-Syntheserate beispielsweise bei 37°C zu erwarten.

Um zu prüfen, ob diese Hypothese zutrifft, wurde in zwei parallelen Ansätzen (Tab. 3, Ansatz 1 und 2) der Komplex aus Rifampicin, Enzym und DNA bei 5°C, in zwei weiteren Ansätzen (Tab. 3, Ansatz 3 und 4) bei 25°C gebildet.

Tab. 3 Einfluß der Reaktionstemperatur auf die Heparinsensitivität der Rifampicin - RNA Polymerase - T4 DNA-Komplexe

Zwei von vier parallelen Ansätzen (Ansatz 1 und 2) wurden nach Zugabe von je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym zur Salzmischung A, die an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH-Puffer, pH 7,9/25°C enthielt (vgl. Methoden, Kap. 1b), in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 15 min bei 5°C vorinkubiert, während die beiden anderen Ansätze 3 und 4 für 15 min bei 25°C vorinkubiert wurden. Anschließend wurde in alle vier Ansätze je 15,0 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 40 µl), und die Inkubation ohne Temperaturwechsel für weitere 15 min fortgesetzt. Der Start der Reaktion bei der jeweiligen Vorinkubationstemperatur erfolgte bei den Ansätzen 1 und 2 durch Zugabe von je 50 µl bei 5°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH-Puffer, pH 7,9/25°C und je 1.2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Bei den Ansätzen 3 und 4 wurde beim Start der Reaktion 50 µl der gleichen, jedoch bie 25°C thermostatisierten Substratlösung zugegeben. Nach einer Reaktionsdauer von 15 min wurde die Reaktionstemperatur von Ansatz 2 von 5 auf 25°C heraufgesetzt, während die Reaktionstemperatur der übrigen Ansätze 1, 2 und 4 nicht geändert wurde. Nach weiteren 10 min wurde in Ansatz 1, 2 und 3 je 10 µl einer 1 mg/ml Heparinlösung (= 10 µg), in Ansatz 4 10 µl H_2O zugegeben, und die Inkubation nochmals für 1 min ohne Temperaturwechsel fortgesetzt. Anschließend wurde die Temperatur bei allen Ansätzen auf 37°C heraufgesetzt, und die Inkubation bei dieser Temperatur fortgesetzt. Jeweils 5 und 10 min nach dem Temperaturwechsel auf 37°C wurden je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen und aus dem Einbau von [^{14}C]UMP in DNTP die jeweilige DNTP-Syntheserate/5 min bestimmt.

Ansatz Nr.	Zugabe von				Ipm/5' Indikatorreaktion bei 37°C
	E/Rif	DNA	Substrat	Hep/H_2O	
1	15'5°C	15'5°C	25'5°C	Hep 1'5°C	72
2	15'5°C	15'5°C	15'5°C ▷10'25°C	Hep 1'25°C	283
3	15'25°C	15'25°C	25'25°C	Hep 1'25°C	261
4	15'25°C	15'25°C	25'25°C	H_2O 1'25°C	320

Danach erfolgte in allen vier Ansätzen bei den genannten Temperaturen der Start der DNTP-Synthese durch Zugabe von Substrat. Alle aktiven Komplexe beginnen daraufhin mit der DNTP-Synthese, während die Enzymmoleküle in der inaktiven Zustandsform des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes in diesem Komplexzustand bleiben. Nach 15 Minuten wurde die Temperatur in Ansatz 2, der bisher bei 5°C gehalten worden war, auf 25°C erhöht. Alle Ansätze wurden 10 Minuten weiter inkubiert. Danach wurde den Ansätzen 1,2 und 3 Heparin, dem Ansatz 4 das entsprechende Volumen Wasser zugesetzt. Damit sich die Wirkung des Heparins entfalten konnte, wurden die Ansätze nochmals eine Minute ohne Temperaturwechsel weiterinkubiert. Diese Zeit reicht aus, um alle labilen Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe, insbesondere auch die bis dahin nicht DNTP synthetisierenden, zu blockieren. Unter den beschriebenen Inkubationsbedingungen hat nämlich selbst bei 0°C eine längere Einwirkdauer von Heparin keine Verstärkung der Hemmwirkung zur Folge (Fig. 21).

Nachdem in den Ansätzen 1, 2 und 3 die bei der jeweiligen Inkubationstemperatur heparinlabilen Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe blockiert worden waren, wurde die Temperatur bei allen vier Ansätzen auf 37°C heraufgesetzt. Diese Temperatur der Indikatorreaktion wurde deshalb gewählt, weil bei ihr die DNTP-Synthese von den aktiven Komplexen optimal katalysiert wird (vgl. Ergebnisse, Kap. II.1, Fig. 9a), und Heparin bei dieser Temperatur die DNTP-Bildung nur sehr wenig beeinflußt (vgl. Ergebnisse, Kap. III.2b, Fig. 19b). Da die Ansätze wegen ihrer unterschiedlichen Ausgangstemperatur die Temperatur der Indikatorreaktion von 37°C nach unterschiedlichen Zeiten erreichen, wurde die Geschwindigkeit der DNTP-Bildung nicht sofort nach dem Temperaturwechsel bestimmt. Vielmehr wurde sie durch die Zunahme des synthetisierten DNTP zwischen der fünften und zehnten Minute nach dem Temperaturwechsel auf 37°C gemessen.

Die Ergebnisse in Tab. 3 zeigen, daß die Geschwindigkeit der DNTP-Bildung bei 37°C stark davon abhängt, bei welcher Temperatur Heparin der Reaktionsmischung zugesetzt worden ist. Man sieht, daß im Ansatz 1, bei dem Heparin bei 5°C zugesetzt worden war, nur wenig DNTP synthetisiert wurde. Dagegen ist die DNTP-Syntheserate im Ansatz 2, bei dem Heparin erst nach der Temperaturerhöhung von 5 auf 25°C zugesetzt worden war, um mehr als das dreifache höher. Diese Syntheserate entspricht etwa dem Wert, der auch in Ansatz 3 beobachtet wird, der von Anfang an auf 25°C gehalten worden war und ist nur

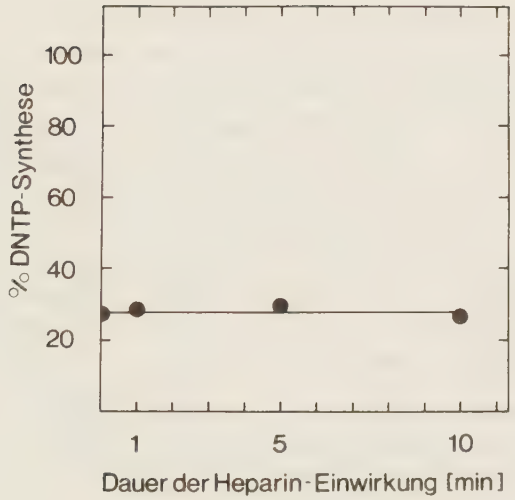


Fig. 21 Stabilität des Rifampicin-RNA Polymerase-T4 DNA-Komplexes während der DNTP-Synthese bei 0°C gegenüber Heparin

Je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym wurde in der Salzmischung A, die an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH-Puffer, pH 7,9/25°C enthielt (vgl. Methoden, Kap. 1b), in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 20 min bei 0°C vorinkubiert. Anschließend wurde je 15,0 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 40 µl), und die Inkubation für weitere 20 min bei 0°C fortgesetzt. Der Start der Reaktion bei 0°C erfolgte jeweils durch Zugabe von 50 µl bei 0°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH-Puffer, pH 7,9/25°C und je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Nach der anschließenden Inkubation der Reaktionsmischung für 20 min bei 0°C wurde je 10 µl einer 1 mg/ml Heparinlösung (= 10 µg) zugefügt. Nach der weiteren Inkubation bei 0°C für die auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurde die Reaktionstemperatur auf 37°C heraufgesetzt, und die Inkubation bei dieser Temperatur fortgesetzt. Analog Tab.3 wurde jeweils 5 und 10 min nach dem Temperaturwechsel je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen, und der jeweilige Einbau von [^{14}C]UMP in DNTP bestimmt. Die bei den verschiedenen Ansätzen jeweils bei 37°C bestimmt Syntheserate wurde auf die in identischer Weise bestimmte DNTP-Syntheserate in Abwesenheit von Heparin (100 % - Wert = 361 Ipm/5 min) bezogen (●).

wenig geringer als in Abwesenheit des Hemmstoffs. Somit spielt es für die Heparinwirkung offenbar keine Rolle, ob der Rifampicin-Enzym-DNA-Komplex bei 25°C gebildet wurde, oder ob die Temperatur erst nach dessen Bildung

5°C auf 25°C erhöht wurde.

Nun wurde in allen Ansätzen nicht die Gesamtmenge an gebildetem DNTP, sondern nur die Geschwindigkeit seiner Bildung in der in allen Fällen gleichen Indikatorperiode bei 37°C analysiert. Diese DNTP-Bildungsrate ist aber ein Maß für die Zahl der Moleküle in der aktiven Zustandsform des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes, da Heparin die Syntheserate von DNTP bei 37°C nur sehr wenig beeinflußt (vgl. Fig. 19b). Somit spiegelt die Steigerung der DNTP-Syntheserate während der abschließenden Indikatorreaktion bei der Erhöhung der Temperatur von 5 auf 25°C vor der Heparinzugabe die Zunahme desjenigen Anteils der Enzymmoleküle wider, der bei der erhöhten Temperatur durch Heparin nicht mehr desaktiviert werden kann.

Die mehr als dreifache Zunahme der DNTP-Syntheserate zeigt daher, daß bei der höheren Temperatur von 25°C etwa drei bis vier Mal mehr heparinstabile Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe als bei 5°C existieren.

Diese unterschiedliche Anzahl der heparinstabilen Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe kann nun nicht dadurch erklärt werden, daß bei den verschiedenen Temperaturen eine unterschiedliche Menge an aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexen durch Heparin desaktiviert wird, da sich der heparinlabile Anteil der aktiven Komplexe bei 5 und 25°C nur wenig unterscheidet (vgl. Ergebnisse, Kap. III.3. 1, Fig. 20). Vielmehr läßt sich der große Unterschied der Anzahl der heparinstabilen Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe in Anbetracht der Tatsache, daß die RNA Polymerase auch bei tiefen Temperaturen zu einem großen Teil an die Matrize gebunden bleibt (Hinkle und Chamberlin, 1972; Mangel und Chamberlin, 1974c; Kerrich-Santo und Hartmann, 1974), nur so erklären, daß es bei 5°C heparinlabile Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe gibt, die die Synthese von DNTP nicht katalysieren können. Die Beobachtung, daß die anschließende DNTP-Bildung durch die Temperaturerhöhung von 5 auf 25°C vor der Heparinzugabe auf etwa den Wert gesteigert werden kann, der auch bei der sofortigen Bildung des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes bei 25°C erreicht wird, zeigt klar, daß sich die bei tiefen Temperaturen inaktiven Komplexe durch die Erhöhung der Temperatur in aktive Komplexe umwandeln lassen.

Die Komplexe zwischen dem Enzym und der Matrize können also in zwei verschiedenen Zustandsformen auftreten, von denen diejenige bei tiefen Temperaturen inaktiv ist, bei der Erhöhung der Temperatur jedoch aktivierbar ist.

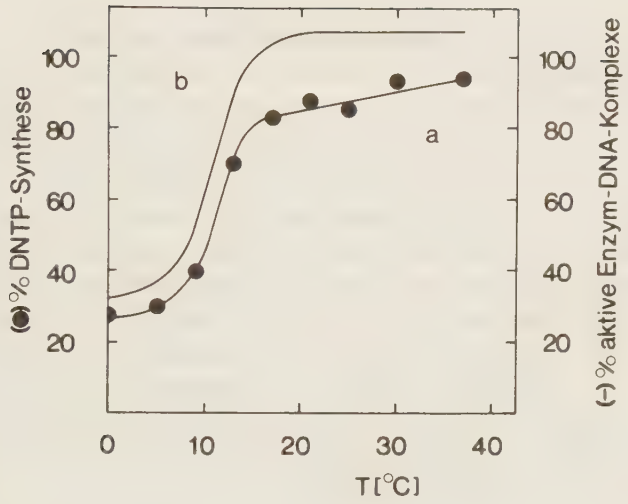


Fig. 22 Temperaturabhängigkeit des heparinstabilen Anteils der Rifampicin-RNA Polymerase-T4 DNA-Komplexe

Je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym wurde in der Salzmischung A, die an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH-Puffer, pH 7,9/25°C enthielt (vgl. Methoden, Kap. 1b), in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 15 min bei der auf der Abszisse jeweils angegebenen Temperatur vorinkubiert. Anschließend wurde je 15,0 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 4o µl), und die Inkubation für weitere 15 min bei der jeweils gleichen Temperatur fortgesetzt. Der Start der Reaktion erfolgte jeweils durch Zugabe von 50 µl bei der angegebenen Temperatur thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH-Puffer, pH 7,9/25°C und je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Nach der weiteren Inkubation der Reaktionsmischung für 15 min bei der auf der Abszisse jeweils angegebenen Temperatur wurde jeweils 10 µl einer 1 mg/ml Heparinlösung (= 10µg) zugesetzt, und die Inkubation für 1 min ohne Temperaturwechsel fortgesetzt. Anschließend wurde die Temperatur bei allen Ansätzen auf 37°C heraufgesetzt, und die Inkubation bei dieser Temperatur fortgesetzt. Jeweils 5 und 20 min nach dem Temperaturwechsel wurden je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen, und der jeweilige Einbau von [^{14}C]UMP in DNTP bestimmt. Die bei den verschiedenen Ansätzen jeweils bei 37°C bestimmten Syntheseraten zwischen der fünften und zwanzigsten Minute nach der Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37°C wurde auf die in identischer Weise bei 37°C bestimmte DNTP-Syntheserate in Abwesenheit von Heparin (100 % = 986 Ipm/15 min) bezogen (●). Die Berechnung der Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der aktiven Rifampicin-RNA Polymerase-T4 DNA-Komplexe (——) erfolgte durch

Da somit die Anzahl der inaktiven und heparinlabilen, jedoch durch die Temperatur aktivierbaren Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe entscheidend von der Reaktionstemperatur abhängt, war es von großem Interesse, den Einfluß der Temperatur auf den Prozentsatz aller aktiven Komplexe genauer zu bestimmen.

Zur Bestimmung dieser Abhängigkeit erfolgte ähnlich wie in Ansatz 1 und 3 von Tab. 3 die Bildung der Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe jeweils bei der auf der Abszisse von Fig. 22 angegebenen Temperatur. Danach wurde die DNTP-Synthese durch Substrat gestartet, wobei die jeweilige Temperatur beibehalten wurde. Nach weiteren 15 Minuten wurde wiederum während der laufenden DNTP-Synthese zu jeder Inkubationsmischung Heparin zugefügt und die Inkubation nochmals eine Minute bei der ursprünglichen Temperatur fortgesetzt. Nach dieser Inaktivierung der bei der jeweiligen Temperatur heparinlabilen Zustände wurde die Temperatur wie bei den in Tab. 3 beschriebenen Versuchen in allen Fällen auf 37°C heraufgesetzt und wiederum nach weiteren fünf Minuten die verbleibende DNTP-Syntheserate bestimmt.

Die Gesamtmenge aller Enzym-DNA-Komplexe wurde ähnlich wie Ansatz 4 von Tab. 3 durch die DNTP-Bildungsrate bei 37°C in Abwesenheit des Hemmstoffs Heparin charakterisiert. So entsprach die Syntheserate in Abwesenheit des Inhibitors der Aktivität aller Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe. Der Prozentsatz der bei den verschiedenen Temperaturen heparinstabilen Komplexe errechnete sich aus dem jeweiligen Verhältnis der DNTP-Syntheseraten in An- und Abwesenheit von Heparin.

Der Verlauf der Temperaturabhängigkeit in Fig. 22, Kurve a zeigt, daß der

---

die Erhöhung des bei den verschiedenen Temperaturen jeweils beobachteten Anteils der heparinstabilen Rifampicin-RNA Polymerase-T4 DNA-Komplexe um den in Fig. 20 (vgl. Ergebnisse, Kap. III.3.1) bestimmten Prozentsatz des bei der entsprechenden Temperatur heparinlabilen Anteils der DNTP-Synthese. Rechenbeispiel: Der Prozentsatz der heparinstabilen aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe beträgt bei 25°C 84 %. Bei dieser Temperatur beträgt aber der Prozentsatz der heparinstabilen DNTP-Synthese 80 %. Also entsprechen die 84 % der heparinstabilen aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe 80 % der Gesamtmenge aller bei 25°C aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe (vgl. auch Anm. 15). Die Gesamtmenge der bei 25°C aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe beträgt somit (84/0.80)% = 105 % aller aktivierbaren Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe (Der Wert über 100 % resultiert wahrscheinlich aus der Fehlerbreite der Meßwerte).

Anteil der Komplexe , der stabil ist gegenüber der Wirkung von Heparin, sehr stark von der Temperatur beeinflußt wird. Während unterhalb 5°C nur etwa 20 % aller Komplexe durch den Hemmstoff nicht inhibiert werden können, nimmt die Zahl der heparinstabilen Komplexe zwischen 5 und 20°C sehr stark zu. Oberhalb 20°C ist der Anteil der stabilen Komplexe wiederum relativ konstant und beträgt etwa 80 bis 90 %.

Nun scheint es in Analogie zur RNA-Synthese plausibel, daß alle heparinstabilen Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe die Synthese von DNTP synthetisieren können. In diesem Fall entspricht der Prozentsatz der Komplexe, der durch Heparin nicht inaktiviert werden kann, dem Anteil der heparinstabilen aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe [15].

Der heparinstabile Anteil der aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe stellt bei allen untersuchten Temperaturen den überwiegenden Teil der aktiven Komplexe dar (vgl. Fig. 20). Da dieser Anteil stark temperaturabhängig ist (Fig. 22, Kurve a),muß auch die Gesamtzahl aller aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe stark von der Temperatur abhängen. Man kann sie berechnen (ausgedrückt in Prozent der bei 37°C durch Aktivitätsmessung erfaßbaren Molekülkomplexe), in dem man die Werte der Kurve a in Fig. 22 um den aus Fig. 20 ablesbaren Anteil an heparinlabilen aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexen erhöht (vgl. Rechenbeispiel in Fig. 22). Die so erhaltenen korrigierten Werte (Fig. 22, Kurve b) zeigen den Einfluß der Temperatur auf den Anteil der gesamten aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe.

Aus dem Verlauf der Abhängigkeit kann man ablesen, daß bei Temperaturen unterhalb 5°C nur etwa 20 bis 30 % der Enzymmoleküle mit der DNA einen aktiven Komplex bilden und somit auch die Synthese von DNTP katalysieren können. Die übrigen Enzymmoleküle bilden mit der Matrize inaktive Enzym-DNA-Komplexe (Hinkle und Chamberlin, 1972; Mangel und Chamberlin, 1974c; Kerrich-Santo und Hartmann, 1974). Bei der Erhöhung der Temperatur nimmt jedoch dieser Anteil der aktiven Komplexe überproportional zu. Der Wendepunkt des sigmoiden

---

[15] Sollten jedoch heparinstabile Zustände existieren, die kein DNTP synthetisieren können, so stellt der Anteil der aktiven, heparinstabilen Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe einen noch geringeren Prozentsatz aller Komplexe dar.

Kurvenverlaufs liegt bei etwa 11°C. Oberhalb 20°C katalysieren alle Komplexe die Synthese von DNTP.

Somit zeigt die starke Temperaturabhängigkeit des Anteils der gesamten aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe, daß die Bildung aktiver und inaktiver Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes entscheidend durch die Temperatur beeinflußt wird. Dabei tritt bei niedrigen Temperaturen vorherrschend der inaktive Zustand auf, der erst bei der Erhöhung der Temperatur in den aktiven Zustand übergehen kann.

3.2b Reversibilität der Aktivierung inaktiver Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob der bei der Erhöhung der Temperatur beobachtete Vorgang der Aktivierung inaktiver Rifampicin- Enzym-DNA-Zustände reversibel ist. Dies würde bedeuten, daß die aktiven und inaktiven Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes über ein temperaturabhängiges Gleichgewicht miteinander verbunden sind. In diesem Falle sollte die erfolgte Aktivierung der inaktiven Zustandsform durch die Erniedrigung der Temperatur wieder rückgängig gemacht werden können.

Da der Einfluß der Temperatur bei der Aktivierung der inaktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe zwischen 5 und 25°C am größten ist, wurde die Temperatur zwischen diesen beiden Extremen variiert (Fig. 23).

Zur Untersuchung der Reversibilität der Aktivierung der inaktiven Komplexe wurde in zwölf parallelen Ansätzen nach der Bildung der Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe bei 5°C die DNTP-Synthese bei der gleichen Temperatur durch die Zugabe von Substrat gestartet. Um sicherzustellen, daß auch bei dieser niedrigen Temperatur alle aktiven Komplexe die Bildung von DNTP katalysieren, wurde die Inkubation bei dieser niedrigen Temperatur über den Zeitraum von 15 Minuten fortgesetzt (vgl. Ergebnisse, Kap. II.1, Fig. 9a). Danach wurde die Neueinstellung des Gleichgewichts zwischen den aktiven und inaktiven Zustandsformen in der Weise erzwungen, daß die Temperatur für 8 Minuten auf 25°C heraufgesetzt wurde. Zu den in Fig. 23 auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurde in die parallelen Ansätze jeweils Heparin zugesetzt und 1 Minute nach Zugabe des Hemmstoffs die Temperatur jeweils auf 37°C erhöht. Die DNTP-Syntheserate im Zeitraum zwischen 5 und 10 Minuten nach Erhöhung der Temperatur auf 37°C spiegelt wiederum den verbliebenen Prozentsatz heparin-

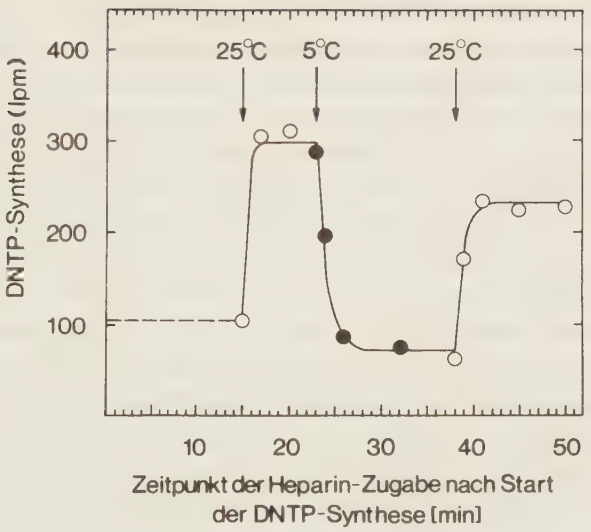


Fig. 23 Reversibilität des Gleichgewichts zwischen aktiven und inaktiven Zustandsformen des Rifampicin-RNA Polymerase-T4 DNA-Komplexes

In zwölf verschiedenen Ansätzen wurde je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym in der Salzmischung A, die an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH-Puffer, pH 7,9/25°C enthielt (vgl. Methoden, Kap. 1b), in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde je 15,0 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 40 µl), und die Inkubation für weitere 10 min bei 25°C fortgesetzt. Danach wurden alle Vorinkubationslösungen auf 5°C abgekühlt. Nach der anschließenden Inkubation für 20 min bei 5°C erfolgte der Start der Reaktion bei 5°C durch Zugabe von je 50 µl bei 5°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen an Stelle von 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C 50 mmol/l HEPES NaOH-Puffer, pH 7,9/25°C und je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielten. Die verschiedenen Reaktionsmischungen wurden, bis sie nacheinander zu den auf der Abszisse angegebenen Reaktionszeiten mit je 10 µl einer 1mg/ml Heparinlösung (= 10 µg) versetzt wurden, zunächst 15 min bei 5°C, dann 8 min bei 25°C (○), dann 15 min bei 5°C (●) und schließlich wiederum 12 min bei 25°C inkubiert. Nach der Zugabe der Heparinlösung wurde die jeweilige Reaktionstemperatur noch 1 min beibehalten, während anschließend in allen Fällen die Temperatur auf 37°C heraufgesetzt wurde. Analog Fig. 22 wurde jeweils 5 und 10 min nach dem Temperaturwechsel auf 37°C je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen und aus dem Einbau von [^{14}C]UMP in DNTP die jeweilige DNTP-Syntheserate/5 min (○,●,○) bestimmt.

stabiler Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe wider (vgl. Ergebnisse, Kap. III.3.2a).

Die Reversibilität wurde nun in der Weise demonstriert, daß in weiteren Parallelansätzen in einer zweiten Periode die Temperatur für weitere 15 Minuten wieder auf 5°C abgesenkt und danach wieder für weitere 12 Minuten auf 25°C gesteigert wurde. Fig. 25 zeigt klar, daß die Temperaturerhöhung in weniger als 2 Minuten die aus dem vorhergehenden Experiment zu erwartende Steigerung der DNTP-Syntheserate während der fünfminutigen Indikatorreaktion bewirkt. Diese Steigerung spiegelt die Zunahme der aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Zustände wider.

Die anschließende Temperaturerniedrigung bewirkt die rasche Abnahme der aktiven Komplexe. Nach 2 bis 3 Minuten verbleiben bei 5°C nur noch 20 bis 30 % der der Aktivität. Die weitere Inkubation bei dieser niedrigen Temperatur hat keine zusätzliche Erniedrigung der DNTP-Synthese zur Folge. Dieser konstante Wert stimmt mit demjenigen überein, der schon nach der ersten Synthesephase bei niedriger Temperatur erhalten wurde und repräsentiert somit den reduzierten Prozentsatz der bei 5°C aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe. Die Bildung inaktiver Zustände kann nun auch ein weiteres Mal durch die Erhöhung der Temperatur wiederum in beträchtlichem Umfang rückgängig gemacht werden.

Das beschriebene Experiment zeigt sehr deutlich, daß der Einfluß der Temperatur auf die Aktivierung von inaktiven Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes mindestens zum großen Teil reversibel ist.

Die aktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Zustände stehen also mit inaktiven Zuständen in einem Gleichgewicht, dessen Einstellung sehr stark von der Temperatur abhängt. Somit spiegelt die Temperaturabhängigkeit der Heparinsensitivität der Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe (Fig. 22, Kurve a) die Einstellung des Gleichgewichts zwischen den aktiven und inaktiven Zustandsformen des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes wider. Da die Wirkung von Heparin in Anwesenheit von Rifampicin untersucht wurde, wird die Einstellung dieses Gleichgewichts durch das Antibiotikum nicht verhindert. Während oberhalb 20°C das Gleichgewicht ganz auf der Seite der aktiven Zustandsform liegt, nimmt unterhalb dieser Temperatur die Zahl der inaktiven Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe überproportional zu. Jedoch können auch bei sehr tiefen Temperaturen noch etwa 20 bis 30 % der Komplexe die Bildung von DNTP katalysieren. Da die Dissoziationskonstante des Enzym-DNA-Komplexes bei Erniedrigung der Temperatur

zunehmend größer wird (Hinkle et al. 1972), ist anzunehmen, daß der bei tiefen Temperaturen vorherrschende inaktive Rifampicin-Enzym-DNA-Komplex (Hinkle und Chamberlin, 1972; Mangel und Chamberlin, 1974c; Kerrich-Santo und Hartmann, 1974) zusätzlich in einem rasch sich einstellenden Gleichgewicht mit freier RNA Polymerase steht.

Zillig et al. (1970) konnten zeigen, daß auch bei der Synthese langkettiger RNA an T4 DNA als Matrize der Praeinitiationskomplex in zwei Zustandsformen unterschiedlicher Heparinsensitivität vorkommt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Untersuchung der Praeinitiationskomplexe an E. coli DNA als Matrize von Pedone et al. (1978) erhalten.

Diese beiden Zustandsformen sind ebenfalls durch ein temperaturabhängiges Gleichgewicht miteinander verbunden (Zillig et al., 1970). Dabei bestimmt ebenfalls die Bildung der heparinstabilen Zustandsform weitgehend das Ausmaß der Initiation der RNA-Synthese. Wiederum treten erst unterhalb 20°C in stark zunehmendem Maße heparinlabile Komplexe auf. Jedoch werden bei tiefen Temperaturen nur etwa 5 % der spezifischen Initiationskomplexe von Heparin nicht inaktiviert, während im Fall der DNTP-Synthese bei 0°C etwa 20 bis 30 % der Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe stabil gegenüber der Wirkung des Hemmstoffs sind. Diese erhöhte Stabilität bei tiefen Temperaturen ist jedoch sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe während der Synthese von DNTP zusätzlich stabilisiert sind.

So beträgt die Halbwertszeit des überwiegenden Teils der Praeinitiationskomplexe bei der RNA-Synthese an T4 DNA bei 37°C nur etwa 10 Minuten (Zechel, 1971). Demgegenüber werden die stabilen Enzym-DNA-Komplexe während der DNTP-Synthese unter gleichen Bedingungen nur mit einer Halbwertszeit von über 5 Stunden inaktiviert (vgl. Ergebnisse, Kap. III.2b, Fig. 19b). Da Rifampicin die Stabilität der aktiven Enzym-DNA-Komplexe gegenüber Heparin nicht verändert (vgl. Ergebnisse, Kap. III.2b), muß die während der DNTP-Synthese stark erhöhte Stabilität direkt auf die kontinuierliche Produktbildung zurückgeführt werden. Dies bedeutet aber, daß nicht erst die Synthese von RNA den Enzym-DNA-Komplexe weitgehend stabilisiert (Fuchs et al. 1967), sondern auch schon die Bildung von DNTP für diese dauerhafte Stabilisierung ausreicht.

Daher bleibt nur während der Synthese von DNTP die Einstellung des Gleichgewichts zwischen den beiden Zustandsformen unterschiedlicher Heparinsensiti-

vität bei der Einwirkung des Hemmstoffs über lange Zeit erhalten. In Abwesenheit von Substrat erzwingt jedoch schon die zehnminutige Einwirkung von Heparin eine merkliche Verschiebung dieses Gleichgewichts in die Richtung des inaktiven Zustands (Zechel, 1971). Daher ist es verständlich, daß nur während der DNTP-Synthese auch bei tiefen Temperaturen Komplexzustände beobachtet werden, die durch Heparin nur sehr langsam inaktiviert werden.

Die weitgehende Übereinstimmung der Temperaturabhängigkeiten der Heparinsensitivität der Enzym-DNA-Komplexe bei der DNTP-Synthese in Anwesenheit von Rifampicin (Fig. 22, Kurve a) und der RNA-Bildung (Zillig et al. 1970) zeigt somit deutlich, daß sowohl die Bildung von DNTP als auch die Initiation langer RNA-Ketten durch dasselbe, den eigentlichen katalytischen Reaktionsschritten vorgelagerte Gleichgewicht zweier Zustandsformen des Praeinitiationskomplexes gesteuert wird. Diese identische Ursache der beobachteten starken Temperaturabhängigkeiten erklärt die Übereinstimmung der berechneten Arrhenius'schen, scheinbaren Aktivierungsenthalpien beider Reaktionen (vgl. Ergebnisse, Kap. II.1).

Die Identität des Reaktionsschrittes, der das Ausmaß beider Reaktionen bei Temperaturen unterhalb 20°C vornehmlich regelt, ist die deutlichste Bestätigung, daß sowohl die DNTP-Synthese als auch die Initiation langkettiger RNA durch das gleiche aktive Zentrum katalysiert werden, und daß somit der Ablauf beider Reaktionen bis zur Ablösung des DNTP-Produkts übereinstimmt.

Dies bedeutet aber, daß die DNTP-Synthese durch den Rifampicin-Enzym-DNA-Komplex als ein Modell für die Initiationsreaktion der Katalyse der Transkription von Desoxyribonucleinsäure unabhängig von der Weiterreaktion der RNA Polymerase in die Elongationsphase angesehen werden kann.

Somit beschreibt auch der von Smagowicz und Scheit (1977) und McClure et al. (1978) vorgeschlagene Mechanismus der Anlagerung der beiden initiierenden Ribonucleosidtriphosphate, der ja auch mit den Daten von Rhodes und Chamberlin (1975) nicht in Widerspruch steht, die Reihenfolge der Bindung der Substrate an den Enzym-DNA-Komplex während der Phase der Initiation der RNA-Synthese.

Mechanistisch gesehen hat die Identität der Bildung von DNTP mit der Initiation der RNA-Synthese zur Folge, daß sich die Reaktionswege der DNTP- und RNA-Synthese erst nach der Knüpfung der ersten Phosphodiesterbindung verzwei-

gen. Während im Fall der RNA-Synthese die RNA-Kette durch die Kondensation eines weiteren Ribonucleosidtriphosphats mit dem gebildeten DNTP verlängert wird, dissoziiert im Fall der DNTP-Synthese das kurze RNA-Produkt schon nach der Knüpfung der ersten Phosphodiesterbindung vom Enzym-DNA-Komplex ab. Dabei bleibt weiterhin ungeklärt, ob dieser Ablösung der Translokationsvorgang vorgeschaltet ist.

Da nun aber die Reaktionsschritte, die zur Bildung von DNTP führen, von Rifampicin nur wenig beeinflußt werden, muß man schließen, daß das Antibiotikum die Synthese langkettiger RNA nicht durch die Verhinderung einer der Reaktionsschritte der Initiation (vgl. Kerrich-Santo und Hartmann, 1974; Mangel und Chamberlin, 1974a und So und Downey, 1970), sondern durch die Blockierung eines Reaktionsschrittes der Elongation des gebildeten Dinucleosidtetraphosphats inhibiert.

IV. Einfluß des dritten Nucleotids auf die DNTP-Synthese

Wie in den vorausgehenden Untersuchungen gezeigt werden konnte, wird die Verknüpfung zweier Ribonucleosidtriphosphate zu DNTP durch E. coli RNA Polymerase während der Initiation der RNA-Synthese durch Rifampicin nur wenig beeinflußt. Jedoch wird die Elongation dieses Moleküls zu längeren RNA-Ketten durch das Antibiotikum fast vollständig verhindert, da nach der Anlagerung des Hemmstoffs an das Enzym schon die Kondensation mit einem weiteren Ribonucleosidtriphosphat zum nächst größeren Oligonucleotid, dem Trinucleosidpentaphosphat, durch die RNA Polymerase nicht mehr katalysiert werden kann (vgl. Ergebnisse, Kap. I.2; Johnston und McClure, 1976; McClure und Cech, 1978).

Somit erhob sich die Frage, ob die Wirkung von Rifampicin durch die spezifische Blockierung einer der Teilprozesse des Elongationsvorgangs erklärt werden kann. Es wurde versucht, Einzelvorgänge dieser komplexen Reaktion zu charakterisieren, um anschließend den Einfluß des Antibiotikums auf diese Reaktionsschritte studieren zu können.

Der gesamte Vorgang der Elongation kann durch das Zusammenwirken von mindestens vier Teilreaktionen charakterisiert werden:

1. Sequenzspezifische Anlagerung des elongierenden Ribonucleosidtriphosphats
2. Knüpfung der neuen Phosphodiesterbindung unter Abspaltung von Pyrophosphat
3. Translokation des Reaktionsprodukts und der als Matrize dienenden DNA
4. Bindung des gebildeten Oligo- bzw. Polyribonucleotids an den Produktbindungsbereich [16)]

---

16) Es sind nur wenige Hinweise bekannt, in welcher Reihenfolge diese Teilprozesse ablaufen. Dabei scheint es aber zwingend zu sein, daß die Anlagerung des neuen Ribonucleosidtriphosphats am Anfang stattfinden muß, da sonst die Verknüpfung mit dem bereits gebildeten RNA-Fragment nicht erfolgen kann. Da die Pyrophosphorolyse von RNA wesentlich langsamer abläuft als die Reaktion des Pyrophosphataustauschs (Maitra und Hurwitz, 1967), wurde vermutet, daß die Abspaltung von Pyrophosphat vor dem Translokationsvorgang stattfinden sollte (Krakow und Fronk, 1969). Weiterhin dürfte die Translokation der

Da die erneute Anlagerung eines Ribonucleosidtriphosphats den Vorgang der Elongation des schon gebildeten Dinucleosidtetraphosphats einleitet, war es zunächst von Interesse zu untersuchen, ob schon diese Bindung des auf die DNTP-Bildung folgenden Nucleotids an den ternären Komplex durch Rifampicin verhindert wird.

Zur Klärung dieser Frage wurde der Einfluß des dritten Nucleotids auf die DNTP-Synthese an der DNA der Deletionsmutante D111 des Phagen T7 als Matrize analysiert. Während die RNA-Bildung an T7 DNA *in vitro* hauptsächlich an den drei starken Promotoren A_1, A_2 und A_3 initiiert wird (Dunn und Studier, 1973), ist die Mutante dadurch charakterisiert, daß *E. coli* RNA Polymerase die *in vitro*-Synthese langkettiger RNA an zwei der drei starken Promotoren, A_2und A_3, nicht mehr beginnen kann (Studier, 1974).

Nun erfolgt die Initiation der Transkription der T7 DNA des Wildtyps *in vitro* nur an den Promotoren A_1 und A_3 mit ATP, am Promotor A_2 jedoch mit GTP (Minkley und Pribnow, 1973; Kramer *et al.*, 1974). Daher fanden Miller und Burgess (1978a) auch bei der Analyse der 5'-Enden der mit ATP initiierbaren Transkriptionsprodukte der T7 Wildtyp DNA lediglich zwei Hauptprodukte. Bei der RNA-Synthese an T7 DNA der Mutante D111 war die Bildung eines dieser beiden Hauptprodukte, das die Autoren dem Promotor A_3 zuordneten, drastisch reduziert, während die Initiation des zweiten Hauptprodukts am Promotor A_1 durch die Mutation nur wenig beeinflußt wird. Die in geringerem Umfang beobachtete Bildung weiterer Transkriptionsprodukte wurde auf die Initiation von RNA-Ketten an schwachen Promotoren zurückgeführt.

Stahl und Chamberlin (1977) konnten nämlich zeigen, daß an T7 D111 DNA die

---

verlängerten RNA-Kette und die Verschiebung des als Matrize dienenden DNA-Rasters nicht unabhängig voneinander sein, sondern synchron ablaufen, da auf Grund der einzelsträngigen Regionen der DNA im ternären Elongationskomplex die Ausbildung eines kurzen RNA-DNA-Hybrids möglich ist (Rohrer und Zillig, 1977). Dabei zeigen Modelluntersuchungen von Chamberlin und Patterson (1965) und Riley *et al.* (1966), daß die Ausbildung eines solchen Hybrids energetisch begünstigt ist. Durch die Translokation wird die wachsende RNA-Kette in den Produktbindungsbereich der RNA Polymerase verschoben (Krakow und Fronk, 1969). In dieser Region ist die wachsende RNA-Kette gegenüber dem Abbau durch RNasen geschützt (Kumar und Krakow, 1975; Rohrer und Zillig, 1977).

in vitro RNA-Synthese bei einem hohen Verhältnis der Enzym- und DNA-Konzentration auch an den schwachen Promotoren B, C, D, E und F beginnen kann. Jedoch geht aus den Messungen der Autoren weiterhin hervor, daß bei limitierenden Enzymkonzentrationen die *in vitro* Transkription von T7 D111 DNA hauptsächlich nur am Promotor A_1 initiiert wird. Daher wurde bei den folgenden Untersuchungen die DNA im Überschuß eingesetzt (Vgl. Methoden, Kap. 1d). Damit war sichergestellt, die Initiation der RNA-Synthese hauptsächlich am Promotor A_1, jedoch nur wenig an den schwachen Promotoren stattfindet.

Nun weist die Tatsache, daß die Spaltung des *Hae* 790-Fragments von λb2 DNA durch eine Restriktionsnuklease aus *Haemophilus influencae* im Promotorbereich nicht nur den Verlust der Bindung der RNA Polymerase an den Promotor P_R und der anschließenden RNA-Synthese, sondern gleichermaßen eine äußerst drastische Reduktion der DNTP-Bildung zur Folge hat (Johnston und McClure, 1976), stark darauf hin, daß die Bildung von DNTP promotorspezifisch abläuft. Ein weiterer Hinweis darauf ist die Tatsache, daß die DNTP-Syntheserate an dem nur den P_R-Promotor enthaltenden *Hae* III-Fragment von λb2 DNA nur etwa 40 % der entsprechenden Bildungsrate an der äquivalenten Menge λb2 DNA, die die beiden pppApU-Synthetisierenden Promotoren P_R und P_L enthält, ausmacht.

Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, daß die pppApU-Syntheserate an T7 D111 DNA, die nur den pppApU-synthetisierenden starken Promotor A_1 enthält, wiederum nur etwa 55 % der Bildungsrate beträgt, die an der äquivalenten Menge T7 DNA, die ja die pppApU-synthetisierenden starken Promotoren A_1 und A_3 enthält, beobachtet wird (vgl. Ergebnisse, Kap. IV.3, Legende von Tab. 4 und 5). Auch die starke Reduktion der DNTP-Syntheserate bei der Bildung von unspezifischen DNA-Fragmenten bei dem Nucleaseabbau von λb2 DNA mit pankreatischer DNase I weist auf die Promotorspezifität der DNTP-Bildung hin.

Da nun die Sequenz des 5'-Endes der am Promotor A_1 von T7 DNA initiierenden RNA-Kette von Kramer *et al.* (1974) als pppApUpCpG aufgeklärt und auch durch die Bestimmung der DNA-Sequenz des A_1-Promotors bestätigt wurde (Siebenlist, 1979a), konnte somit an T7 D111 DNA als Matrize der spezifische Einfluß des dritten Ribonucleotids unbeeinflußt von störenden Nebenreaktionen an Hand der Wirkung von CTP und CMP auf das Ausmaß der pppApU-Synthese analysiert werden.

1. Vergleich der Wirkung von CTP und CMP auf die DNTP-Synthese

Johnston und McClure (1976) konnten zeigen, daß die Synthese von pppApU mit ATP und UTP als Substrat an λb2 DNA durch GTP und CTP in jeweils gleichem Umfang inhibiert werden kann. Die Autoren führten diese gleichmäßige Hemmung durch GTP oder CTP darauf zurück, daß in Anwesenheit von einem der beiden Ribonucleosidtriphosphate E. coli RNA Polymerase jeweils nur an einem der beiden Promotoren P_R oder P_L die Synthese von pppApU synthetisieren kann, während am jeweils anderen Oligonucleotide gebildet werden. Im Gegensatz dazu konnte die pppApU-Bildung am Hae III-Fragment von λb2 DNA als Matrize nur durch GTP fast vollständig inhibiert werden, während die Zugabe von CTP nur eine relativ geringe Reduktion der Bildung dieses Dinucleosidtetraphosphats zur Folge hat. Die Autoren führten die beobachtete spezifische Reduktion durch GTP darauf zurück, daß das verwendete Restriktionsfragment nur noch den P_R-Promotor enthält, und daher in diesem Fall die RNA-Synthese nur in Anwesenheit von ATP, UTP und GTP über die promotorspezifische Bildung von pppApU hinaus bis zur Stufe des zur Matrize komplementären Oligoribonucleotids pppApUpGpUpA ablaufen kann. Die Bildungsrate dieses Oligoribonucleotids entsprach jedoch nicht der Reduktion der DNTP-Syntheserate, sondern erfolgte nur in wesentlich geringerem Ausmaß. Dies hat seine Ursache darin, daß das gebildete Oligoribonucleotid nur sehr langsam vom ternären Komplex abdissoziieren kann (McConnel und Bonner, 1973).

Es stellte sich nun die Frage, ob auch schon die Bildung eines Trinucleosidpentaphosphats eine ähnliche Reduktion der DNTP-Synthese zur Folge hat. Darüber hinaus wurde untersucht, ob vielleicht nicht erst die Verknüpfung des initiierenden pppApU mit CTP zu pppApUpC, sondern auch schon allein die Anlagerung des dritten Nucleotids die Verminderung der Bildungsrate von pppApU bewirkt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde der Einfluß von CTP und CMP auf die pppApU-Synthese an T7 D111 DNA als Matrize studiert. Dabei wurden die beiden Nucleotde in einer Konzentration von jeweils 1 mmol/l eingesetzt.

1a. Einfluß von CTP

Da die DNTP-Synthese promotorspezifisch abläuft (Johnston und McClure, 1976), ist am Promotor A_1 von T7 D111 DNA in Anwesenheit lediglich von ATP, UTP und CTP die Bildung von pppApUpC möglich. Es wurde daher zunächst der Einfluß von CTP auf die pppApU-Synthesearte an T7 D111 DNA als Matrize bestimmt.

Dazu wurde nach der Bildung des Enzym-DNA-Komplexes die pppApU-Synthese bei 25°C in einem von zwei parallelen Inkubationsmischungen mit ATP und UTP, im anderen durch Hinzufügen von ATP, UTP und CTP als Substrat gestartet. Fig. 24 zeigt, daß nicht nur an T4 DNA als Matrize (vgl. Ergebnisse, Kap. I.1, Fig. 1), sondern auch an T7 D111 DNA allein mit ATP und UTP als Substrat die kontinuierliche Bildung von pppApU beobachtet werden kann. Diese kontinuierliche pppApU-Bildung wird jedoch in Gegenwart von CTP fast vollständig inhibiert (Fig. 24). Dabei bleibt die drastische Senkung der Syntheserate über die gesamte Inkubationsdauer erhalten.

Da in Abwesenheit von GTP über die Bildung des Trinicleosidpentaphosphats hinaus keine weitere Kettenverlängerung stattfinden kann (vgl. Siebenlist, 1979a), muß die starke Hemmung der DNTP-Syntheserate darauf zurückgeführt werden, daß sich auf Grund der speziellen Basensequenz der T7 D111 DNA am Promotor A_1 pppApUpC bilden kann. In der Tat wird bei der chromatographischen Analyse der Reaktionsprodukte die Synthese von Oligonucleotiden mit mehr als drei verknüpften Nucleotiden nicht beobachtet (ohne Beleg). Jedoch auch die Bildung von pppApUpC läuft nur in geringem Umfang ab (ohne Beleg). Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da der ternäre Komplexe nach der Bildung eines Trinucleotids äußerst stabil ist (Dausse et al., 1975).

Somit wird in Anwesenheit von CTP die Bildung von pppApU dadurch stark reduziert, daß die Ablösung des in diesem Fall nur intermediär gebildeten DNTP vom Enzym-DNA-Komplex nur noch in geringem Umfang stattfinden kann, da die zur Ablösung parallele RNA-Synthese bis zur Stufe des Trinucleosidpentaphosphats weiterlaufen kann und dadurch eine weitgehende Stabilisierung des ternären Produktkomplexes bewirkt.

1b. Einfluß von CMP

Es war nun von großem Interesse, ob eine Stabilisierung des ternären Komplexes nicht nur durch den gesamten Ablauf der Elongation des Dinucleosidtetraphosphats zu Trinucleosidpentaphosphat, sondern auch schon allein durch den Teilprozeß der Anlagerung des der DNTP-Bildung folgenden Nucleotids erreicht werden kann.

Um diese Anlagerungsreaktion von den Folgereaktionen der Elongation zu trennen, diente CMP als CTP-analoges Substrat. Dieses analoge Nucleotid ist auf Grund der fehlenden Triphosphatgruppe nicht mehr zur Bindungsknüpfung befä-

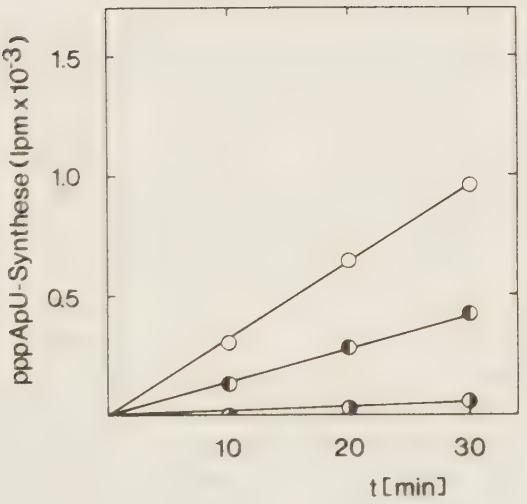


Fig. 24 Vergleich der Wirkung von CTP und CMP auf die pppApU-Syntheserate an T7 DNA

In drei parallelen Ansätzen wurde analog den Standardbedingungen der DNTP-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 10.2) der Salzmischung A, die 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C, 0,1 mmol/l DTE, 1,75 mmol/l $MgCl_2$ und 50 mmol/l KCl enthielt, je 2,5 µg RNA-Polymerase-Holoenzym, 6,5 µg T7 DNA gegeben (result. Vol. je 50 µl). Diese Lösungen wurden für 10 min bei 25°C inkubiert. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte durch Zugabe von je 50 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C, 0,1 mmol/l DTE, 16 mmol/l $MgCl_2$ und 50 mmol/l KCl, 1,2 mmol/l ATP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) entweder 2 mmol/l CTP, 2 mmol/l CMP oder keine weiteren Zusätze enthielt. Zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurde jeweils 25 µl der Reaktionsmischung entnommen und der jeweilige Einbau von [^{14}C]UMP in pppApU in Anwesenheit von CTP (◑), CMP (◐) oder in Abwesenheit eines zusätzlichen Nucleotids (○) bestimmt.

higt (Chamberlin und Berg, 1961). Jedoch ist anzunehmen, daß sich dieses Nucleotid wegen der unveränderten Nucleosidstruktur an die Substratbindungsstelle anlagern kann. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, daß das initiierende Ribonucleosidtriphosphat ebenfalls durch das entsprechende Monophosphat ersetzt werden kann (Krakow und Fronk, 1969; Johnston und McClure, 1976;

McClure und Cech, 1978; Shemyakin et al., 1978).
Untersucht man daher den Einfluß von CMP auf die pppApU-Synthese, so stellt man fest, daß schon die Anwesenheit dieses bezüglich der Bindungsknüpfung inaktiven Nucleotids eine dauerhafte Hemmung dieser DNTP-Bildung hervorruft (Fig. 24). Dabei beträgt die von CMP hervorgerufene Reduktion der pppApU-Syntheserate etwa 55 %.

Nun ist die Verknüpfung von CMP mit dem initiierenden pppApU wegen der fehlenden Pyrophosphatgruppe nicht möglich [17]. Daher kann die beobachtete Reduktion der pppApU-Bildungsrate durch CMP im Gegensatz zur Wirkung von CTP nicht in der Stabilisierung des ternären Komplexes durch die Bildung von pppApUpC begründet sein. Jedoch ist es durchaus vorstellbar, daß durch eine unspezifische Kompetition von CMP um die ATP- oder UTP-Bindungsstelle ein inaktiver "dead end"-Komplex gebildet wird (Rhodes und Chamberlin, 1974). Da aber die Reduktion der pppApU-Syntheserate nur durch das der DNTP-Bildung sequenzspezifisch folgende Ribonucleosidmonophosphat hervorgerufen wird (vgl. Ergebnisse, Kap. IV.3), muß man diese spezifische Wirkung auf die Stabilisierung des gebildeten pppApU am Initiationskomplex durch die nachfolgende Anlagerung von CMP an das Enzym zurückführen.

Nun ist es wenig wahrscheinlich, daß die Anlagerung des folgenden Ribonucleotids allein schon die Translokation des gebildeten Dinucleosidtetraphosphats und dadurch eine Stabilisierung des ternären Produktkomplexes durch diesen Vorgang auslöst. Dies würde nämlich bedeuten, daß die bei der Bindungsschließung auftretende freie Energie der Pyrophosphatabspaltung von 7,6 kcal/mol = 31,8 kJ/mol (Jenks et al., 1960), bzw. 10,3 kcal/mol = 43,2 kJ/mol (Schuegraf et al., 1960) für den Vorgang der Translokation keine Bedeutung hätte.

Vielmehr muß man schließen, daß die Bindung des gebildeten pppApU an den Initiationskomplex ausschließlich durch die Anlagerung des CMP an das Enzym wesentlich stabilisiert wird.

---

17) Die Tatsache, daß hochgereinigtes CMP ebenfalls die pppApU-Bildung in identischer Weise wie nicht nachgereinigtes, käufliches CMP herabsetzt (ohne Beleg), beweist, daß die beobachtete Erniedrigung der DNTP-Bildungsrate auch nicht auf Spuren von CTP in der CMP-Präparation zurückzuführen ist.

Über die konformative Anordnung des neu eintretenden Nucleotids ist nichts bekannt. Jedoch ist anzunehmen, daß die Base des elongierenden Nucleotids über eine stapelförmige Anordnung mit dem schon synthetisierten RNA-Molekül in hydrophobe Wechselwirkung tritt, da diese Anordnung energetisch stark begünstigt ist [18].

Weiterhin wird der ternäre Komplex bei der Anlagerung von CMP um den Enthalpiebetrag der Wasserstoffbrückenbindung der Basenpaarung zwischen dem Cytosinteil des sich anlagernden Nucleotids und der Desoxyguanosinbase der Matrize zusätzlich stabilisiert [19].

---

18) So zeigen Modelluntersuchungen an verschiedenen Dinucleosidmonophosphaten mit Hilfe von Lichtabsorptions- und Lichtemissionsmessungen und der Bestimmung der Spektren des Zirkulardichroismus, der optischen Rotationsdispersion und der Protonenkernresonanz (vgl. Bloomfield et al., 1974), daß die beiden Basen von Dinucleosidmonophosphaten in wässriger Lösung in Wechselwirkung treten und daher eine stapelförmige Anordnung annehmen. Dabei zeigt nicht nur der stark negative Temperaturkoeffizient dieser Wechselwirkung (Applequist und Damle, 1966; Bangerter und Chan, 1969), sondern auch der Einfluß des pH-Werts (Warshaw und Tinoco, 1965) und von Dimethylsulfoxid (Ts'o et al., 1969), daß die gegenüber den entsprechenden Mononucleotiden auftretende Stabilisierung durch eine hydrophobe Wechselwirkung bei der stapelförmigen Anordnung der Basen erreicht wird. Diese stapelförmige Anordnung ist je nach Zusammensetzung der Dinucleotide um einen Enthalpiebetrag von 6,1 - 8,0 kcal/mol = 25,6 - 33,5 kJ/mol (Brahms et al., 1967), bzw. 4,8 - 8,4 kcal/mol = 20,1 - 35,2 kJ/mol (Davis und Tinoco, 1968) begünstigt. Weiter konnte an Trinucleosiddiphosphaten gezeigt werden, daß die Konformation der Trimeren den Dimeren sehr ähnlich ist (Cantor und Tinoco, 1965). Auch wurde an poly rA-Ketten errechnet, daß die Enthalpie der hydrophoben Wechselwirkung pro dazutretender Base einen ähnlichen Betrag ausmacht (Leng und Felsenfeld, 1966; Applequist und Damle, 1966).

19) Da nur bei der Transkription einzelsträngiger DNA die Bildung eines RNA-DNA-Hybrids nachgewiesen werden konnte (Warner et al., 1963; Bishop, 1969; Tabak und Borst, 1971), ist es bei doppelsträngiger DNA nicht geklärt, ob während der RNA-Synthese eine solche Hybridstruktur ausgebildet wird. Jedoch ist eine direkte Wechselwirkung mindestens zwischen den Basen des eintretenden Nucleotids und der komplementären Base der Matrize auf Grund der hohen Selektivität der Transkription zwingend anzunehmen (Springgate und Loeb, 1975; Bick, 1975). Da aber die Matrize im ternären Komplex partiellen Einzelstrangcharakter besitzt (Rohrer und Zillig, 1977; Melnikova et al., 1978), ist eine Stabilisierung des ternären Komplexes durch die direkte Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Base des eintretenden Nucleotids und der komplementären Base des kodogenen Strangs der Matrize äußerst wahrscheinlich. Modellrechnungen, die die Geometrie der beteiligten Basen berücksichtigen, ergeben für die Wechselwirkung der G/C-Paarung eine Bindungsenthalpie von 14 bzw. 15 kcal/mol = 58 bzw. 63 kJ/mol (Pullmann, 1968; Nash und Bradley, 1966).

Berücksichtgt man darüber hinaus noch die Wechselwirkung des bindenden Nucleotids mit der Bindungsstelle der RNA Polymerase, so ist eindeutig, daß der Gesamtprozeß der Anlagerung von CMP an den ternären Komplex mit einer großen negativen Enthalpieänderung verbunden ist.

Demgegenüber ist die Änderung der Entropie bei der Anlagerung der Nucleotide nicht bekannt (vgl. Bloomfield, 1974). Nun ist aber wegen des hohen Ordnungsgrads des katalytischen Bereichs des Enzym-DNA-Komplexes anzunehmen, daß die Entropieänderung bei der Anlagerung von CMP negativ ist. Die Höhe der vorher beschriebenen gesamten Enthalpieänderung macht es jedoch sehr wahrscheinlich, daß dieser Entropieverlust zumindest bei niedrigeren Temperaturen übertroffen wird, und somit die Gesamtreaktion der CMP-Anlagerung bei 25°C durch eine negative Änderung der freien Energie gekennzeichnet ist. Dies bedeutet aber, daß die Anlagerung des elongierenden Nucleotids an den ternären Komplex auch schon ohne die anschließende Bindungsknüpfung energetisch begünstigt ist.

Diese Anlagerung hat aber zur Folge, daß durch die beiden Basenwechselwirkungen, die aus der Wasserstoffbrückenbindung zur komplementären Base der Matrize und aus der stapelförmigen Anordnung der RNA-Bausteine resultieren, das schon gebildete Dinucleosidtetraphosphat an den ternären Komplex in der Weise verankert wird, daß das gebildete pppApU nur noch wesentlich langsamer vom Produktkomplex abdissoziieren kann.

Somit stabilisiert nicht nur, wie im Fall der Zugabe von CTP, der volle Ablauf des folgenden Elongationsschrittes, sondern auch schon allein die Anlagerung des folgenden Nucleotids den ternären Komplex bei 25°C so weit, daß die pppApU-Synthese nur noch reduziert ablaufen kann.

2. Einfluß von Rifampicin auf die Reduktion der DNTP-Synthese

Wie die vorausgehenden Untersuchungen zeigten, reduziert sowohl CTP als auch CMP bei 25°C die Bildung von pppApU an T7 D111 DNA als Matrize. Jedoch ist das Ausmaß der Reduktion der pppApU-Syntheserate in beiden Fällen verschieden. Die unterschiedliche Herabsetzung der Bildungsrate konnte darauf zurückgeführt werden, daß die beiden Nucleotide den ternären Komplex durch zwei prinzipiell verschiedene Reaktionsweisen stabilisieren. Während durch die Anlagerung von CMP die Bindung des gebildeten pppApU am Initiationskomplex hauptsächlich durch die Wechselwirkung der Cytidinbase mit den Basen

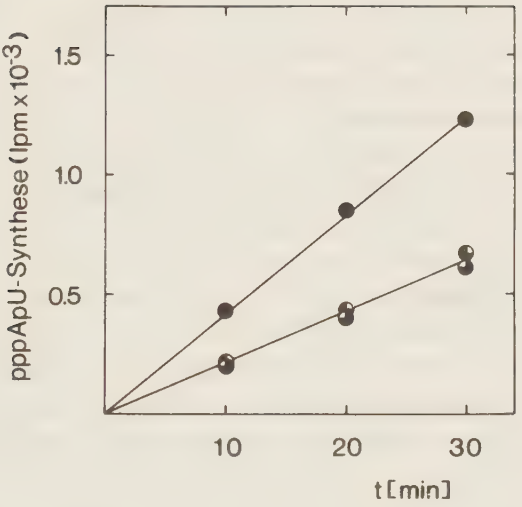


Fig. 25 Vergleich der Wirkung von CTP und CMP auf die pppApU-Syntheserate an T7 D111 DNA in Anwesenheit von Rifampicin

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen von Fig. 24 mit Ausnahme der Änderung identisch, daß jeweils 2,0 µg freies RNA Polymerase Holoenzym in der modifizierten Salzmischung A vor der Zugabe der T7 D111 DNA in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert wurde. Die Bestimmung der DNTP-Synthese in Anwesenheit von CTP (◕), CMP (◔) oder in Abwesenheit eines zusätzlichen Nucleotids (●) erfolgte wie in Fig. 24 beschrieben.

der Matrize und des bereits gebildeten DNTP stabilisiert wird, erfolgt im Fall der CTP-Anlagerung eine zusätzliche Stabilisierung durch die anschließende Weiterreaktion zu pppApUpC.

Es stellte sich die Frage, in welcher Weise Rifampicin die Wirkung von CTP und CMP beeinflußt. Dabei ist das Ausmaß der Reduktion der pppApU-Syntheserate ein Kriterium dafür, welche Teilreaktionen der Elongation des gebildeten DNTP nach Zugabe des dritten Nucleotids noch ablaufen können.

Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst der Einfluß des Hemmstoffs auf die Wirkung von CTP untersucht. Dazu erfolgte in zwei parallelen Inkubationsmi-

schungen bei 25°C nach der Bildung des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes der Start der anschließenden DNTP-Synthese einmal durch Zugabe von ATP und UTP, während das andere Mal zusätzlich mit diesen beiden Ribonucleosidtriphosphaten noch CTP hinzugefügt wurde.

Fig. 25 zeigt, daß die RNA Polymerase an T7 D111 DNA als Matrize nach Inkubation mit ATP und UTP auch nach der Bindung von Rifampicin die Synthese von pppApU katalysiert. Dabei ist die Syntheserate wie auch schon bei T4 DNA als Matrize gegenüber der DNTP-Bildung in Abwesenheit des Antibiotikums um etwa 20 % erhöht (vgl. Ergebnisse, Kap. I.4; II.1). Diese Steigerung ist wohl wiederum auf die Blockierung einer noch in minimalem Umfang ablaufenden RNA-Restsynthese zurückzuführen (vgl. Ergebnisse, Kap. I,4, Anm. 5).

Betrachtet man zunächst die Wirkung von CTP auf diese pppApU-Bildung, so stellt man fest, daß dieses Nucleotid die Bildung von pppApU auch noch nach der Vorinkubation des freien Enzyms mit Rifampicin stark reduziert. Dabei entspricht die etwa 50 %ige Hemmung aber nicht dem Ausmaß der fast vollständigen Inhibierung der pppApU-Synthese im rifampicinfreien System (vgl. Fig. 24). Dies ist jedoch zu erwarten, da eine Stabilisierung des gebildeten pppApU durch die vollständige Weiterreaktion zum entsprechenden Trinucleosidpentaphosphat durch das Antibiotikum verhindert wird (vgl. Ergebnisse, Kap. I.2)

Jedoch stimmt das Ausmaß der beobachteten Reduktion genau mit der Verminderung der pppApU-Synthese überein, die in Abwesenheit von Rifampicin durch CMP bewirkt wurde (vgl. Ergebnisse, Kap. IV.1b). Nun konnte diese Reduktion der pppApU-Syntheserate durch CMP auf die Stabilisierung der Bindung des Dinucleosidtetraphosphats an den ternären Initiationskomplex zurückgeführt werden, die sich allein aus der Anlagerung des folgenden Nucleotids ergibt (vgl. Ergebnisse, Kap. IV.1b).

Daher legt die Übereinstimmung der Reduktion der pppApU-Syntheserate durch CTP in Anwesenheit von Rifampicin mit derjenigen, die im rifampicinfreien System auch schon durch CMP erreicht wurde, nahe, daß nach der Bindung des Antibiotikums an die RNA Polymerase auch die Wirkung von CTP allein in der Stabilisierung durch die der Bildung von pppApU folgenden Anlagerung dieses Nucleotids an das Enzym begründet ist. Dies bedeutet aber, daß die zusätzliche Stabilisierung des gebildeten pppApU, die durch die Reaktion der Triphosphatgruppe des bindenden Nucleotids ausgelöst wird, in Anwesenheit von Rifampicin nicht mehr wirksam werden kann.

Diese Vorstellung wird dadurch erhärtet, daß in Gegenwart des Hemmstoffs auch schon CMP die pppApU-Syntheserate ebenfalls um 50 % inhibieren kann (Fig.25).

Die identische Reduktion der pppApU-Bildungsrate durch CTP und CMP in Anwesenheit von Rifampicin um den Betrag, der in Abwesenheit des Hemmstoffs ausschließlich durch CMP erreicht wurde, weist deutlich darauf hin, daß die Anlagerung des elongierenden Ribonucleosidtriphosphats an den Initiationskomplex durch Rifampicin nicht verhindert wird. Vielmehr inhibiert das Antibiotikum einen Teilprozeß der Elongation, an dem die Triphosphatgruppe des elongierenden Nucleotids funtionell beteiligt ist.

Dies bedeutet aber darüber hinaus, daß der Vorgang der Anlagerung unabhängig von der Anwesenheit des Hemmstoffs schon durch die Wirkung von CMP auf die Synthese vor pppApU sichtbar gemacht werden kann.

3. Spezifität der Wirkung von CMP

In Anwesenheit von Rifampicin reduzieren sowohl CTP als auch CMP in identischer Weise die Bildung von pppApU um den Betrag, der im rifampicinfreien System allein durch CMP bewirkt wird. Diese Identität wurde dadurch gedeutet, daß nach der Bindung von Rifampicin an die RNA Polymerase die Stabilisierung des gebildeten pppApU am Enzym-DNA-Komplex bei beiden Nucleotiden lediglich auf die zusätzliche Anlagerung zurückzuführen ist.

Nun konnten Rhodes und Chamberlin (1974) zeigen, daß auch die poly r(A-U)-Synthese an poly d(A-T) als Matrize durch hohe Konzentrationen sowohl an komplementären als auch nicht komplementären Substraten inhibiert werden kann. Diese Autoren führen die Inaktivierung auf eine unspezifische Kompetition aller untersuchten Substrate um die Substratbindungsstelle und die daraus resultierende Bildung eines inaktiven "dead end" Komplexes (vgl. Cleland, 1963) zurück. Diese Inhibierung ist jedoch unspezifisch, da nicht nur für alle vier Ribonucleosidtriphosphate, sondern sogar auch für Tripolyphosphat eine jeweils ähnliche Inhibierungskonstante beobachtet wurde.

Es erhob sich nun die Frage, ob die beobachtete Reduktion der pppApU-Synthese durch CMP eine spezifische Wirkung des elongierenden Nucleotids darstellt, oder durch die unspezifische Bildung eines inaktiven "dead end" Komplexes erklärt werden muß.

Um die Spezifität der Wirkung von CMP zu prüfen, wurde der Einfluß der vier Ribonucleosidmonophosphate AMP, GMP, CMP und UMP auf die pppApU-Syntheserate zunächst an T7 D111 DNA als Matrize studiert. Dazu wurde die Reduktion der pppApU-Synthese mit ATP und UTP als Substrat in Gegenwart der einzelnen Ribonucleosidmonophosphate bei 25°C miteinander verglichen. Das Ausmaß der jeweiligen Reduktion ergab sich aus dem Verhältnis der konstanten pppApU-Bildung in An- und Abwesenheit des entsprechenden Monophosphats (vgl. Fig. 24 und 25).

Da bei limitierenden Enzymkonzentrationen die RNA-Synthese an T7 D111 DNA hauptsächlich nur am Promotor A_1 katalysiert werden kann (Stahl und Chamberlin, 1977), sollte an dieser Matrize auf Grund der Anfangssequenz von pppApUpC (Kramer et al, 1974) bei einer spezifischen Wirkung der Monophosphate nur CMP die Bildung von pppApU erniedrigen. Im Gegensatz dazu war bei einer unspezifischen Wirkung zu erwarten, daß alle vier Ribonucleosidmonophosphate die pppApU-Syntheserate nahezu gleichmäßig reduzieren.

Betrachtet man zunächst die Wirkung der einzelnen Monophosphate auf die pppApU-Syntheserate in Abwesenheit von Rifampicin, so ist klar zu sehen, daß ausschließlich CMP die Bildung von pppApU drastisch reduziert (Tab. 4). Die anderen drei Monophosphate beeinflussen die pppApU-Synthese nur in sehr geringem Umfang.

Wie die analogen Versuche in Anwesenheit von Rifampicin zeigen, wird diese Spezifität durch das Antibiotikum nicht verändert (Tab. 4).

Die spezifische Wirkung von CMP an T7 D111 DNA als Matrize weist stark darauf hin, daß dieses Mononucleotid die Bildung von pppApU nicht durch die unspezifische Bildung eines inaktiven "dead end" Komplexes reduziert. Vielmehr stützt dieses Ergebnis stark die Vorstellung, daß sich CMP nach der pppApU-Bildung als drittes Nucleotid sequenzspezifisch an den Initiationskomplex anlagert und dadurch die Bindung des schon synthetisierten pppApU am Enzym-DNA-Komplex stabilisiert.

Die Abhängigkeit der Wirkung der Ribonucleosidmonophosphate von der Sequenz der Matrize bestätigt sich auch bei der Analyse der Wirkung der Monophosphate auf die pppApU-Synthese an der DNA des Wildtyps des Phagen T7 als Matrize. Während an der DNA der Deletionsmutante D111 bei limitierenden Enzymkonzentrationen pppApU hauptsächlich nur am Promotor A_1 gebildet wird, kann

Tab. 4 Einfluß von AMP, GMP, CMP und UMP auf die pppApU-Bildung an T7 D111 DNA in Ab- und Anwesenheit von Rifampicin

Je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym wurde unter den in Fig. 24 angegebenen Bedingungen in Ab- und Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde je 16,5 µg T7 D111 DNA zugegeben (result. Vol. je 50 µl), und die Inkubation für weitere 10 min bei 25°C fortgesetzt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von je 50 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den in Fig. 24 angegebenen Salzkonzentrationen 1,2 mmol/l ATP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) entweder 2 mmol/l eines der angegebenen Ribonucleosidmonophosphate oder das entsprechende Volumen H_2O enthielt. Die jeweilige prozentuale Reduktion der pppApU-Syntheserate durch die verschiedenen Monophosphate in Ab- und Anwesenheit von Rifampicin wurde aus dem Verhältnis der in An- und Abwesenheit der verschiedenen Nucleosidmonophosphate beobachteten Syntheseraten, die analog Fig. 24 aus dem jeweils linearen zeitlichen des Einbaus von [^{14}C]UMP in pppApU bestimmt wurden, ermittelt.

100 % - Wert (- Ribonucleosidmonophosphat, - Rifampicin) : 1680 Ipm/h

100 % - Wert (- Ribonucleosidmonophosphat, + Rifampicin) : 2260 Ipm/h

Substrat	Ausmaß der pppApU-Synthese (%)	
	- Rifampicin	+ Rifampicin
ATP,UTP	100	100
ATP,UTP,AMP	109	87
ATP,UTP,GMP	102	86
ATP,UTP,CMP	40	43
ATP,UTP,UMP	95	103

die pppApU-Bildung an der DNA des Wildtyps von T7 zusätzlich am Promotor A_3 katalysiert werden (vgl. Pribnow, 1975). Da die an diesem Promotor initiierte RNA mit pppApUpG beginnt, war zu erwarten, daß nicht nur CMP, sondern auch GMP die Synthese von pppApU reduziert. Verstärkt sollte jedoch die Reduktion erst bei einer Mischung aus CMP und GMP auftreten.

Wie die Daten in Tab. 5 zeigen, wird die pppApU-Syntheserate an T7 DNA als Matrize durch AMP und UMP nur sehr wenig beeinflußt. Im Gegensatz dazu erniedrigt GMP die pppApU-Bildung um 13 %, CMP um 27 %. Die Reduktion, die durch die gleichzeitige Wirkung von CMP und GMP erreicht wird, entspricht etwa der Addition der Einzeleffekte der beiden Monophosphate und ist mit der Reduktion vergleichbar, die von CMP allein an T7 D111 DNA bewirkt wurde.

Betrachtet man den Einfluß der Ribonucleosidmonophosphate auf die Bildung von pppApU nach der Bindung von Rifampicin an das freie Enzym, so sieht man, daß das Antibiotikum die spezifisch abgestufte Wirkung der verschiedenen Monophosphate nicht verändert (Tab. 5).

Dieser additive Einfluß ausschließlich von CMP und GMP auf die pppApU-Synthese an T7 DNA als Matrize zeigt wiederum, daß die Wirkung der Ribonucleosidmonophosphate spezifisch von der Sequenz der Matrize abhängt.

Diese Spezifität der Wirkung der verschiedenen Ribonucleosidmonophosphate in Ab- und Anwesenheit von Rifampicin zeigt deutlich, daß der reduzierende Einfluß der Monophosphate nicht auf der unspezifischen Bildung eines inaktiven "dead end" Komplexes beruhen kann, die auf der schon von Chamberlin und Berg (1964) beschriebenen schwachen Wechselwirkung zwischen allen Substraten und einer gemeinsamen Bindungsstelle basiert. Vielmehr muß die spezifische Wirkung von CMP an T7 D111 DNA als Matrize auf die Verankerung des gebildeten pppApU am Produktkomplex durch die nachfolgende Anlagerung des dritten Nucleotids zurückgeführt werden. Da Rifampicin die Spezifität der CMP-Wirkung nicht verändert, muß man schließen, daß das Antibiotikum die Anlagerung des elongierenden Substrats nicht verhindert.

4. Einfluß der CMP-Konzentration

Um zu prüfen, ob die bei den vorausgehenden Experimenten eingesetzte CMP-Konzentration von 1 mmol/l für die optimale Wirkung ausreichend ist, oder ob bei der weiteren Steigerung der Konzentration noch eine zusätzliche Re-

Tab. 5 Einfluß von AMP, GMP, CMP und UMP auf die pppApU-Bildung an T7 DNA in Ab- und Anwesenheit von Rifampicin

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen in Tab. 4 mit Ausnahme der Änderung identisch, daß an Stelle von je 16,5 µg T7 D111 DNA 15,0 µg T7 DNA eingesetzt wurde. Auch die Auswertung der erhaltenen Syntheseraten erfolgte analog Tab. 4.

100 % - Wert (- Ribonucleosidmonophosphat, - Rifampicin) : 4920 Ipm/h

100 % - Wert (- Ribonucleosidmonophosphat, + Rifampicin) : 3880 Ipm/h

Substrat	Ausmaß der pppApU-Synthese (%)	
	- Rifampicin	+ Rifampicin
ATP,UTP	100	100
ATP,UTP,AMP	96	98
ATP,UTP,GMP	87	89
ATP,UTP,CMP	73	74
ATP,UTP,UMP	98	108
ATP,UTP,CMP,GMP	54	59

duktion der pppApU-Syntheserate erfolgt, wurde untersucht, in welcher Weise die Konzentration des zugesetzten CMP die Reduktion der pppApU-Bildung beeinflußt. Gleichzeitig wurde bestimmt, ob die Anwesenheit von Rifampicin die Konzentrationsabhängigkeit der CMP-Wirkung verändert.

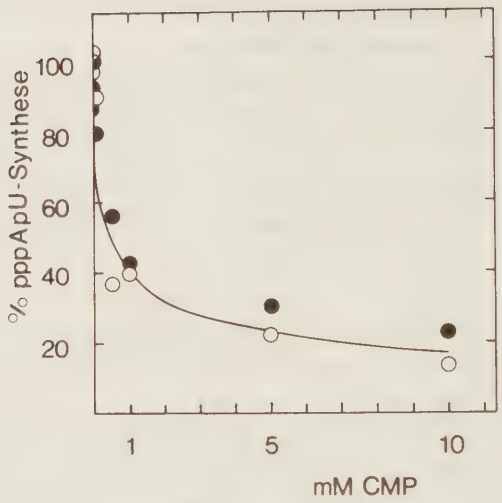


Fig. 26 Konzentrationsabhängigkeit der CMP-Wirkung

Die experimentellen Bedingungen waren mit denen in Tab. 4 mit Ausnahme der Änderung identisch, daß Substratlösungen verwendet wurden, die neben den in Fig. 24 angegebenen Salzkonzentrationen und 1,2 mmol/l ATP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) jeweils die doppelten der auf der Abszisse angegebenen CMP-Konzentrationen enthielten. Die jeweilige prozentuale Syntheserate im CMP-haltigen System in An (●)- und Abwesenheit (○) von Rifampicin wurde durch den Bezug auf die pppApU-Syntheserate im CMP-freien System in Anwesenheit (100 % - Wert = 2250 Ipm/h) und Abwesenheit (100 % - Wert = 1790 Ipm/h) von Rifampicin ermittelt.

Dazu wurde zunächst die pppApU-Syntheserate an T7 D111 DNA bei 25°C bei konstanten ATP- und UTP-Konzentrationen, jedoch steigenden CMP-Konzentrationen bestimmt.

Wie in Fig. 26 deutlich zu sehen ist, nimmt die Reduktion der Syntheserate von pppApU bis zu der Konzentration von etwa 1 mmol/l besonders stark zu. Oberhalb dieser Konzentration steigt die Inhibierung der pppApU-Bildungsrate nur noch in geringem Maße an. Dies bedeutet aber, daß die in den vorausgegangenen Experimenten eingesetzte CMP-Konzentration für die nahezu volle Entfaltung der inhibitorischen Wirkung dieses Nucleotids ausreichend ist.

Die Tatsache, daß der reduzierende Einfluß von CMP bei 1 mmol/l schon nahezu optimal ist und bei wesentlich größeren Konzentrationen nur noch wenig gesteigert werden kann, ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die reduzierende Wirkung von CMP nicht auf die unspezifische Kompetition um die ATP- oder UTP-Bindung zurückgeführt werden kann. Sowohl Rhodes und Chamberlin (1974) an poly d(A-T) als auch Smagowitz und Scheit (1977) an T7 DNA als Matrize konnten zeigen, daß die Bildung eines inaktiven "dead end" Komplexes meßbar erst bei Konzentrationen größer 1 mmol/l auftritt. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist aber nicht möglich, da die Untersuchungen der genannten Autoren bei 37°C durchgeführt wurden.

Wird die Konzentrationsabhängigkeit der CMP-Wirkung erst nach der Bindung von Rifampicin an die RNA Polymerase bestimmt, so beobachtet man eine identische Abhängigkeit der Reduktion der pppApU-Synthese (Fig. 26). Dies weist wiederum darauf hin, daß das Antibiotikum die Anlagerung des der Bildung von pppApU folgenden Nucleotids nicht verhindert.

5. Einfluß der Temperatur auf die Wirkung von CMP

Die bisher beschriebenen Experimente stützen die Vorstellung, daß die Reduktion der pppApU-Synthese durch CMP darauf basiert, daß durch die Anlagerung dieses Nucleotids die Bindung des schon gebildeten pppApU an den Initiationskomplex stabilisiert wird. Nun ist diese Anlagerung von CMP an den Produktkomplex wegen des hohen Ordnungsgrads des katalytischen Bereichs der RNA Polymerase im Komplexverband mit der Matrize sehr wahrscheinlich mit einer starken Entropieabnahme verbunden. Auf Grund der Gibbs-Helmholtz'schen Beziehung $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ wird dieser Entropieverlust bei Erhöhung der Temperatur immer reaktionsbestimmender.

Falls nun die Reduktion der Bildung von pppApU durch CMP darauf zurückzuführen ist, daß das gebildete pppApU am ternären Komplex lediglich durch die Anlagerung, nicht aber zusätzlich durch die folgende Bindungsknüpfung stabilisiert wird, ist zu erwarten, daß diese Stabilisierung stark von der Temperatur abhängt. Dabei sollte der stabilisierende Einfluß von CMP bei der Erniedrigung der Temperatur immer stärker zur Geltung kommen. Daher war von Interesse zu untersuchen, in welcher Weise die Temperatur das Ausmaß der Reduktion der pppApU-Synthese durch CMP beeinflußt.

Dazu wurde bei verschiedenen Temperaturen der Einfluß von CMP auf die Bil-

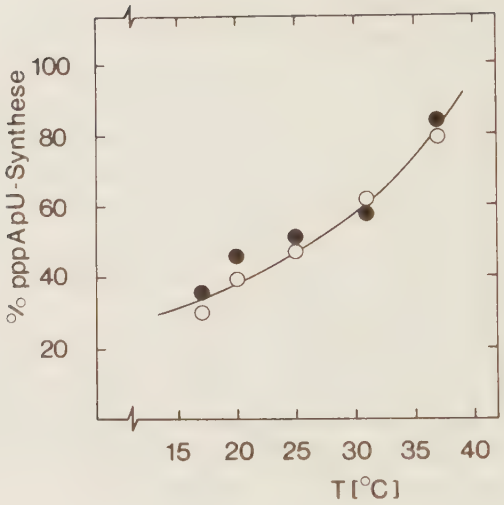


Fig. 27 Temperaturabhängigkeit der CMP-Wirkung

Für jede der auf der Abszisse angegebenen Temperaturen wurde die Wirkung von CMP auf die pppApU-Synthese in der Weise bestimmt, daß bei jeder Temperatur unter Salzbedingungen, die mit denen in Fig. 24 mit dem Unterschied identisch waren, daß 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C gegen 50 mmol/l HEPES NaOH-Puffer, pH 7,9 bei der jeweils angegebenen Temperatur ersetzt wurde, in jeweils zwei parallelen Ansätzen 3,1 µg RNA Polymerase Holoenzym in An- und Abwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin bei 17°C für 20 min, bei den übrigen Temperaturen für 10 min vorinkubiert wurde. Anschließend wurde je 24,9 µg T7 D111 DNA zugegeben (result. Vol. je 75 µl), und die Inkubation für die bei der vorausgehenden Vorinkubation jeweils angegebenen Zeiträume fortgesetzt. Der Start der Reaktion bei der jeweils angegebenen Temperatur erfolgte durch Zugabe von je 75 µl bei der jeweiligen Temperatur thermostatisieren Substratlösung, die der in Fig. 24 in Anwesenheit von 2 mmol/l mit der Änderung entsprach, daß 50 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C gegen 50 mmol/l HEPES NaOH, pH 7,9 bei der jeweils angegebenen Temperatur ersetzt wurde. Die jeweilige prozentuale Reduktion der pppApU-Synthese durch CMP in An(●)- und Abwesenheit (○) von Rifampicin wurde aus dem Verhältnis der bei den verschiedenen Temperaturen beobachteten Syntheseraten, die analog Fig. 24 aus dem jeweiligen zeitlichen Verlaufs des konstanten Einbaus von [^{14}C]UMP in pppApU bestimmt wurden, in An- und Abwesenheit von CMP ermittelt. Die bei den verschiedenen Temperaturen jeweils als Bezugswert dienenden pppApU-Bildungsraten in Abwesenheit von CMP:

17°C = 360 Ipm/h
20°C = 900 Ipm/h
25°C = 1680 Ipm/h
31°C = 4200 Ipm/h
37°C = 7800 Ipm/h

dungsrate von pppApU bestimmt. Da bei allen untersuchten Temperaturen eine stetige DNTP-Synthese beobachtet wurde, zeigt der jeweilige Quotient der DNTP-Bildungsrate in An- und Abwesenheit von CMP den Grad der Hemmung der pppApU-Bildung durch dieses Nucleotid an.

In Fig. 27 ist klar zu erkennen, daß die Wirkung von CMP stark von der Temperatur beeinflußt wird. Dabei beträgt die Reduktion der pppApU-Syntheserate bei der niedrigsten untersuchten Temperatur von 17°C etwa 70 %. Das Ausmaß der Inhibierung nimmt bei der Erhöhung der Temperatur zunehmend ab. So wird die Bildung von pppApU bei 37°C nur noch zu etwa 20 % gehemmt. Wird nun die Wirkung von CMP in Anwesenheit von Rifampicin vermessen, ergibt sich ein identischer Kurvenverlauf (Fig. 27).

Die starke Abhängigkeit der Wirkung von CMP von der Temperatur bestätigt wiederum, daß allein durch die Anlagerung dieses Nucleotids an den Initiationskomplex mit T7 D111 DNA als Matrize die Bindung des schon gebildeten pppApU an den ternären Komplex stabilisiert wird. Die Beobachtung, daß Rifampicin die Temperaturabhängigkeit der CMP-Wirkung nicht verändert, ist wiederum damit in Einklang, daß das Antibiotikum den Prozeß der Anlagerung des elongierenden Nucleotids nicht inhibiert.

Dieses Ergebnis beinhaltet aber, daß die Blockierung der Elongation des gebildeten Dinucleosidtetraphosphats zum jeweiligen Trinucleosidpentaphosphat durch Rifampicin nicht dadurch erklärt werden kann, daß das Antibiotikum die Bindung des folgenden Nucleotids an den ternären Synthesekomplex verhindert. Vielmehr weist die spezifische Reduktion der pppApU-Synthese durch CMP an T7 D111 DNA als Matrize stark darauf hin, daß Rifampicin einen Prozeß der Elongation des gebildeten DNTP zu längeren RNA-Ketten inhibiert, der erst nach der Anlagerung des elongierenden Nucleotids stattfindet.

V. Einfluß von RNA auf die Wirkung von Rifampicin

Die Analyse der spezifischen Wirkung von CMP auf die DNTP-Synthese ergab, daß die Anlagerung des dritten Nucleotids an den ternären Komplex durch Rifampicin nicht beeinflußt wird. Dies bedeutet aber, daß das Antibiotikum die Bildung von Trinucleosidpentaphosphat nicht dadurch inhibiert, daß sich das elongierende Nucleotid nicht mehr an den binären Enzym-DNA-Komplex anlagern kann.

Nun fanden kürzlich McClure und Cech (1978), daß E. coli RNA Polymerase am λP_R-Promotor bei der Inkubation mit ADP oder AMP an Stelle von ATP als das die Initiation einleitende Nucleotid auch nach der Bindung von Rifampicin an das Enzym nicht nur die Kondensation zweier Nucleotide zum jeweils entsprechenden Dinucleotid, sondern weitergehend durch die Knüpfung der zweiten Phosphordiesterbindung auch noch die Bildung von Trinucleotiden katalysieren kann. Diese Beobachtung weist stark darauf hin, daß der Hemmstoff über die Substratanlagerung hinaus auch die Fähigkeit der E. coli RNA Polymerase zur Bindungsschließung prinzipiell nicht blockiert. Da jedoch unter normalen Inkubationsbedingungnen die Bildung von Trinucleosidpentaphosphat und somit die Knüpfung der zweiten Phosphodiesterbindung nicht beobachtet wird, ist zu vermuten, daß Rifampicin die Elongation des initiierenden DNTP nicht durch die direkte Blockierung der Bindungsschließung, sondern durch die Inhibierung eines an die Knüpfung der Phosphodiesterbindung gekoppelten Reaktionsschritts verhindert.

Nun wird aber durch die Bildung der Phosphodiesterbindung und die anschließende Translokation die wachsende RNA-Kette in den Produktbindungsbereich verschoben (Krakow und Fronk, 1969; Krakow et al., 1976). In diesem Bereich ist die wachsende Ribonucleinsäure gegenüber dem RNase-Abbau weitgehen geschützt (Kumar und Krakow, 1975; Rohrer und Zillig, 1977).

Es stellte sich daher die Frage, ob Rifampicin die Knüpfung der zweiten Phosphodiesterbindung und damit den gesamten Vorgang der Elongation des Dinucleosidtetraphosphats zum Trinucleosidpentaphosphat dadurch verhindert, daß die nachfolgende Bindung des kurzen RNA-Moleküls an den Produktbindungsbereich des Enzym-DNA-Komplexes nicht mehr möglich ist.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde untersucht, ob zwischen der Bindung von RNA und Rifampicin an den binären Komplex ein direkter Zusammenhang besteht.

Dazu wurde zunächst versucht zu klären, welchen Einfluß die *in vitro* Synthese langkettiger RNA auf die Bindung des Antibiotikums an die RNA Polymerase im Enzym-DNA-Komplex ausübt.

V.A Stabilisierung des Enzym-DNA-Komplexes durch in vitro RNA-Synthese

Inkubiert man freie *E. coli* RNA Polymerase bei 25°C mit Rifampicin, so wird das Enzym im Hinblick auf die RNA-Synthese in weniger als 6 Sekunden vollständig inaktiviert (Kerrich, 1973). Lill *et al.* (1970) konnten zeigen, daß jedoch im Komplex mit DNA der überwiegende Teil der RNA Polymerase trotz der Anwesenheit des gleichzeitig mit den Substraten zugegebenen Hemmstoffs die Synthese langkettiger RNA initiieren kann. Diese Beobachtung wurde dadurch gedeutet, daß das Enzym im Komplex mit der Matrize durch das Antibiotikum nur wesentlich langsamer als im freien Zustand angegriffen werden kann [20].

Wird Rifampicin jedoch erst nach dem Start der RNA-Synthese zum ternären Komplex gegeben, so beobachtet man unabhängig von der verwendeten Matrize, daß die Bildung von RNA nach der Zugabe des Antibiotikums zunächst nahezu ungehindert weiterlaufen kann (Sippel und Hartmann, 1968; Neuhoff *et al.*, 1970; Yarbrough *et al.*, 1976; Kessler und Hartmann, 1977). Auch setzt analog dazu die rifampicininduzierte DNTP-Synthese erst verzögert und nur in vermindertem Umfang ein (Kessler und Hartmann, 1977). Reduziert man nach erfolgter Initiation die Elongationsgeschwindigkeit der RNA-Bildung durch Erniedrigung der Temperatur auf 0°C, so ist das Enzym im ternären Komplex gegenüber der Wirkung des Antibiotikums über mehrere Stunden hinweg weitgehend geschützt (Lill und Hartmann, 1973).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Bindung von Rifampicin zwar schon

---

[20] Diese Vorstellung wird durch den Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziationsreaktion von Rifampicin an freie RNA Polymerase und den T7 DNA-RNA Polymerase Holoenzym-Komplex bestätigt. Wehrli *et al.* (1976) konnten nämlich zeigen, daß diese bei 37°C durch die Bindung des Enzyms an T7 DNA von $1{,}2 \times 10^{8}$ mol l^{-1} sec^{-1} auf $3{,}0 \times 10^{3}$ mol l^{-1} sec^{-1} reduziert wird. Auch die Fluoreszensmessungen von Bähr *et al.* (1976) und Yarbrough *et al.* (1976) und die indirekten kinetischen Untersuchungen von Hinkle *et al.* (1972), Kerrich-Santo und Hartmann (1974) und Temple und Rhodes (in Vorbereitung) zeigen ganz klar, daß *E. coli* RNA Polymerase im Komplex mit der Matrize wesentlich langsamer als im freien Zustand mit Rifampicin reagiert.

allein durch die Anlagerung der RNA Polymerase an die Matrize stark verlangsamt wird, eine dauerhafte Stabilität des Enzyms gegenüber der Wirkung des Antibiotikums erst im ternären Transkriptionskomplex durch die Bildung von RNA erreicht wird.

Um zu zeigen, daß die stark verlangsamte Bindung von Rifampicin an die RNA Polymerase im ternären Komplex letztlich erst durch die gebildete RNA verursacht wird, wurde zunächst der Einfluß des Wirkstoffs auf die katalytische Aktivität der E. coli RNA Polymerase während verschiedener Stadien der in vitro RNA-Synthese an T4 DNA als Matrize studiert.

1a. Wirkung von Rifampicin zu Beginn der in vitro RNA-Synthese

Gibt man zu Beginn der in vitro RNA-Synthese bei 25°C Rifampicin gleichzeitig mit allen vier Ribonucleosidtriphosphaten zum Komplex aus E. coli RNA Polymerase und T4 DNA, so beobachtet man in Übereinstimmung zu Versuchen von Hinkle et al. (1972) an T7 DNA als Matrize, daß bei niedriger Ionenstärke die RNA-Synthese durch den Hemmstoff zunächst nur sehr wenig beeinflußt wird (Fig. 28a). Jedoch wird diese RNA-Bildung nach dem Ablauf von etwa 2 Minuten durch Rifampicin zunehmend gehemmt. Diese verzögert einsetzende Inhibierung der Bildung langkettiger RNA ist aber nicht vollständig. Trägt man daher den Grad der Hemmung, charakterisiert durch das jeweilige Verhältnis der RNA-Synthese in An- und Abwesenheit des Hemmstoffs, in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer auf, so ergibt sich, daß etwa 35 % der in Abwesenheit des Antibiotikums ablaufenden RNA-Synthese schon nach 6 bis 8 Minuten inhibiert werden (Einschub, Fig. 28a). Die Halbwertszeit dieser relativ raschen, jedoch erst nach etwa 2 Minuten einsetzenden Hemmung beträgt etwa 1 bis 2 Minuten. Der restliche Anteil der Bildung langkettiger RNA wird auch innerhalb der gesamten vierzigminutigen Inkubation nur äußerst langsam gehemmt. Dabei beträgt die Halbwertszeit dieser langsamen Inaktivierung etwa 3 Stunden (Einschub, Fig. 28a).

Schon in Abschnitt I.2 konnte gezeigt werden, daß bei der Inkubation mit allen vier Ribonucleosidtriphosphaten DNTP nur nach der Bindung von Rifampicin an RNA Polymerase als vorherrschendes Reaktionsprodukt gebildet wird. Somit charakterisiert nicht nur der Verlauf der RNA-Synthese, sondern zusätzlich auch der Beginn und das Ausmaß der DNTP-Synthese die Stabilität der RNA Polymerase gegenüber Rifampicin während der Synthese langkettiger

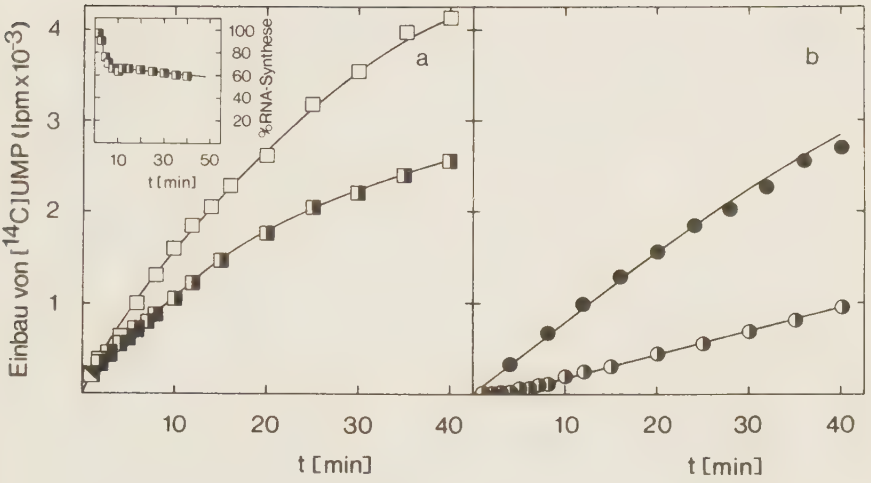


Fig. 28 Einfluß von Rifampicin auf das Ausmaß der RNA- und DNTP-Synthese bei Zugabe zu Beginn der RNA Polymerase-Reaktion

Je 10,2 µg RNA Polymerase Holoenzym wurde in der Salzmischung A (vgl Methoden, Kap. 1a) für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde je 75,0 µg T4 DNA zugegeben (result. Vol. je 250 µl), und die Inkubation für 10 min bei 25°C fortgesetzt. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte durch Zugabe von 250 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) zusätzlich 4 µg/ml Rifampicin enthielt. Zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurde je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen und der jeweilige Einbau von [^{14}C]UMP in RNA und DNTP bestimmt. Dabei wurde die RNA-Synthese (◨) in Fig. 28a aufgetragen und mit der identisch bestimmten RNA-Synthese in Abwesenheit von Rifampicin (□) verglichen. Der Einschub in Fig. 28a zeigt die prozentuale Abnahme der RNA-Syntheserate bei Zugabe von Rifampicin zu Beginn der Reaktion (◨) als Funktion der Reaktionsdauer. Die bei der Zugabe von Rifampicin beim Start der Reaktion ebenfalls auftretende DNTP-Synthese (◑) wurde in Fig. 28b aufgetragen und mit der identisch bestimmten DNTP-Synthese nach Vorinkubation des freien Enzyms mit Rifampicin (●) verglichen.

RNA. Verfolgt man daher zusätzlich die Bildung von DNTP, so beobachtet man, daß die Synthese dieses Reaktionsprodukts nicht spontan, sondern erst nach einer Verzögerungsphase von ebenfalls etwa 2 Minuten einsetzt (Fig. 28b). Anschließend nimmt die DNTP-Syntheserate nur langsam weiter zu und erreicht

analog der Reduktion der RNA-Bildung erst nach etwa 6 bis 8 Minuten ihren optimalen Wert. Danach läuft die Bildung von DNTP über die gesamte Inkubationsdauer mit konstanter Geschwindigkeit ab, die etwa 35 % der Syntheserate nach Bindung des Antibiotikums an die entsprechende Menge freien Enzyms ausmacht.

Es stimmt nicht nur die Zeitspanne, die nach der Zugabe des Rifampicin-Substratgemischs bis zur optimalen Bildung des für den Rifampicin-Enzym-DNA-Komplex charakteristischen Syntheseprodukts DNTP vergeht, mit dem Zeitraum überein, im dem die verzögerte Hemmung des labilen Anteils der RNA-Synthese vollständig abgelaufen ist, sondern es entspricht auch der Prozentsatz der unter den vorgegebenen Bedingungen durch Rifampicin maximal induzierbaren DNTP-Bildung dem Teil der RNA-Synthese, der durch das Antibiotikum innerhalb des frühen Zeitraums inhibiert werden kann.

Da die DNTP-Synthesegeschwindigkeit unabhängig davon ist, ob Rifampicin sich vor oder nach der Bildung des binären Komplexes aus Enzym und Matrize an die RNA Polymerase gebunden hat (ohne Beleg), ist die konstante DNTP-Bildung ein Maß für den Anteil der Enzym-DNA-Komplexe, der relativ rasch durch Rifampicin angegriffen werden kann. Daher scheint nicht nur die unvollständige Hemmung der RNA-Synthese sondern auch das nur geringe Ausmaß der DNTP-Bildung darauf hinzuweisen, daß die RNA Polymerase zu Beginn der RNA-Synthese in Zuständen verschiedener Sensitivität gegenüber der Wirkung des Antibiotikums vorliegt.

In Wirklichkeit unterschieden sich diese beiden nur scheinbar prinzipiell verschiedenen Enzymzustände lediglich durch das unterschiedliche kinetische Verhalten der binären Komplexe während des Vorgangs der Initiation.

Da die Matrize die Bindung von Rifampicin an RNA Polymerase im binären Komplex aus Holoenzym und DNA verlangsamt (Wehrli et al., 1976), ist es verständlich, daß diejenigen RNA Polymerase-Moleküle, die zur raschen Initiation befähigt sind, nach der Zugabe der vier Ribonucleosidtriphosphate zunächst trotz der Anwesenheit des Antibiotikums die Bildung langkettiger RNA nahezu unbeeinflußt initiieren können. Diese zunächst ungehinderte Initiation konnte direkt dadurch gezeigt werden, daß Rifampicin bei Temperaturen über 25°C zu Beginn der Reaktion auf den Einbau von [γ^{32}P]ATP keinen Einfluß zeigt (Chamberlin und Ring, 1972; Kerrich-Santo und Hartmann, 1974).

Dies hat aber zur Folge, daß der Anteil der binären Komplexe, der die RNA-Synthese rasch initiieren kann, schon bald nach der Zugabe des Substrats als ternärer Transkriptionskomplex vorliegt und somit nur noch sehr langsam durch Rifampicin angegriffen werden kann (vgl. Ergebnisse, Kap. V.A.3). Das Ausmaß der nur langsam hemmbaren RNA-Synthese zeigt nun, daß sich unter den vorgegebenen Inkubationsbedingungen etwa 65 % der binären Komplexe durch die rasche Bildung langkettiger RNA dauerhaft gegen die Wirkung des Antibiotikums stabilisieren können.

Wie kommt nun aber die verzögerte, unvollständige Hemmung der RNA-Synthese und somit auch der ebenfalls verzögerte Beginn der entsprechenden Bildung von DNTP zustande?

Von Chamberlin und Ring (1972) wurden auf Grund von Untersuchungen an T7 DNA als Matrize postuliert, daß die Wirkung von Rifampicin auf die RNA-Synthese dadurch erst verzögert eintritt, daß wegen der Stabilität des ternären Komplexes das Antibiotikum erst während eines vermuteten, späteren Reinitiationsvorgangs an freies Enzym binden kann. Da die verzögerte Hemmung der RNA-Synthese aber sowohl an T4 als auch an T7 DNA zu beobachten ist (vgl. auch Kerrich-Santo und Hartmann, 1974), der Prozeß der Reinitiation jedoch im Gegensatz zu T7 DNA an T4 DNA als Matrize bei niedriger Ionenstärke nur eine sehr geringe Rolle spielt (Schäfer und Zillig, 1973), ist es wenig wahrscheinlich, daß die beschriebene verzögerte Hemmung der RNA-Synthese auf die Bindung des Antibiotikums an freie RNA Polymerase während des Vorgangs der Reinitiation zurückzuführen ist.

Vielmehr legt die Übereinstimmung der Halbwertszeit der relativ raschen Inhibierung der RNA-Synthese mit der von Kerrich-Santo und Hartmann (1974) bestimmten Halbwertszeit der Desaktivierung des binären Komplexes aus E. coli RNA Polymerase und T4 DNA bei 25°C nahe, daß der Anteil der RNA-Synthese, der nach einer Verzögerungszeit von etwa 2 Minuten inaktiviert wird, Enzym-DNA-Komplexe widerspiegelt, die die Synthese langkettiger RNA nur langsam initiieren können.

Diese Vorstellung wird dadurch unterstützt, daß sowohl Chamberlin und Ring (1972), Kerrich-Santo und Hartmann (1974) als auch Kumar und Krakow (1975) an verschiedenen Matrizen zeigen konnten, daß der Vorgang der Initiation langkettiger RNA mindestens eine bis drei Minuten dauert. Travers und Burgess (1969), Richardson (1970) und Schäfer et al. (1973) beschreiben, daß

bei niedriger Ionenstärke die Initiation von RNA an T7 DNA erst nach etwa 10 Minuten beendet ist. Weiter verdeutlichen die Untersuchungen von Müller und Bremer (1969), ebenfalls an T4 DNA als Matrize, daß die Initiation relativ kurzer RNA-Moleküle 20 Minuten andauern kann.

Diese lange Dauer der Initiationsphase ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedliche Initiationsgeschwindigkeit von Enzymmolekülen zurückzuführen, die an verschiedenen Bereiche der Matrize gebunden sind. So mußten Stahl und Chamberlin (1977) aus der Analyse der Transkriptionsprodukte von T7 D111 DNA schließen, daß RNA Polymerase, die an den schwachen Promotor C gebunden ist, im Gegensatz zu Enzymmolekülen, die sich an die anderen Promotoren angelagert haben, die Synthese langkettiger RNA nur langsam initiieren kann.

Da somit die Initiation der RNA-Synthese an verschiedenen Promotoren unterschiedlich schnell initiiert wird, ist die unterschiedliche Stabilität der RNA Polymerase während der RNA-Synthese gegenüber der Wirkung von Rifampicin wohl auf die Heterogenität der Matrize zurückzuführen.

Die dauerhafte Stabilität des überwiegenden Anteils der RNA Polymerase nach dem Beginn der Bildung von RNA zeigt jedoch deutlich, daß das Enzym im ternären Transkriptionskomplex durch die Synthese langkettiger RNA entscheidend gegenüber dem Angriff des Antibiotikums stabilisiert wird.

1b. Einfluß der GTP- und CTP-Konzentration

Bei der Untersuchung der Wirkung von Rifampicin auf den Verlauf der *in vitro* RNA-Synthese bei Zugabe des Hemmstoffs zu Beginn der Reaktion wurde der labile Anteil der RNA-Bildung auf nur langsam initiierende Enzym-DNA-Komplexe zurückgeführt. Diese Interpretation unterscheidet sich deutlich von der Vorstellung von Chamberlin und Ring (1972). Diese Autoren vermuten, daß an T7 DNA als Matrize die verzögerte partielle Inhibierung der RNA-Synthese durch die Bindung des Antibiotikums an die freie RNA Polymerase während der Phase der Reinitiation von RNA-Ketten verursacht wird.

Um direkt zu zeigen, daß an T4 DNA der Vorgang der Reinitiation nicht für die verzögerte Wirkung des Hemmstoffs verantwortlich ist, wurde der Einfluß von Rifampicin zu Beginn der *in vitro* RNA-Synthese unter optimalen ATP- und UTP-Konzentrationen, jedoch zunehmend geringeren GTP- und CTP-Konzentrationen untersucht.

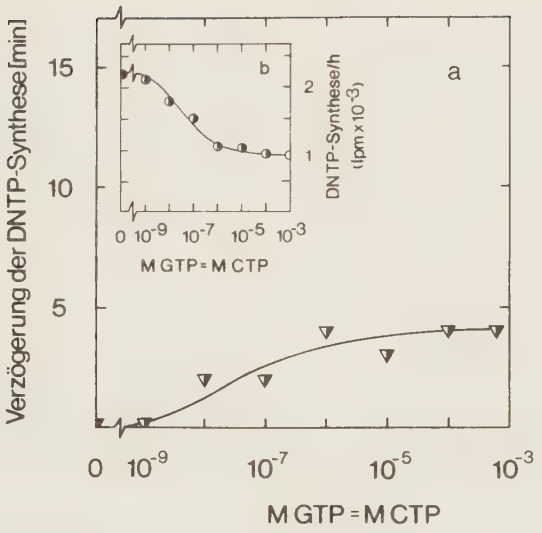


Fig. 29 Einfluß der GTP- und CTP-Konzentration auf die Verzögerungsdauer der optimalen DNTP-Synthese

Analog Fig. 28 wurde der zeitliche Verlauf der DNTP-Bildung nach Zugabe von Substratlösungen bestimmt, die neben den Standardsalzkonzentrationen, 4 µg/ml Rifampicin, 1,2 mmol/l ATP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) die beiden restlichen Ribonucleosidtriphosphate in den doppelten auf der Abszisse angegegebenen Konzentrationen enthielten. Dabei wurde die bei den verschiedenen GTP- und CTP-Konzentrationen beobachtete unterschiedliche Dauer der Verzögerung der optimalen DNTP-Bildung (▼) aus dem Schnittpunkt des jeweils extrapolierten linearen Bereichs der DNTP-Bildung (vgl. Fig. 28b) mit der Zeitachse bestimmt (Fig.29a).Fig.29b zeigt die optimale DNTP-Syntheserate (◑) als Funktion der Konzentration von GTP und CTP bei Zugabe von Rifampicin beim Start der Reaktion.

Da die Transkription von T4 DNA in vitro hauptsächlich mit pppApU initiiert wird (Maitra et al, 1970; Bautz et al., 1970; Downey et al., 1971), kann die Initiation der langkettigen RNA unter den optimalen ATP- und UTP-Konzentrationennahezu ungehindert ablaufen. Jedoch wird die Geschwindigkeit der Elongation der RNA-Ketten bei der Reduktion der für diesen Prozeß essentiellen Ribonucleosidtriphosphate GTP und CTP drastisch herabgesetzt (vgl. Ergebnis-

se, Kap. I.1, Fig. 2).

Diese reduzierte Elongationsgeschwindigkeit hat aber zwangsläufig zur Folge, daß auch der mögliche Vorgang der Reinitiation bei der Herabsetzung der GTP- und CTP-Konzentration von 600 auf 1 µmol/l immer später auftreten sollte. Führt man die beobachtet verzögerte Rifampicinwirkung (vgl. Fig. 28a,b) auf den Angriff des Antibiotikums auf die freie RNA Polymerase während der Phase der Reinitiation zurück, so ist in diesem Fall zu erwarten, daß die Bindung des Wirkstoffs an das Enzym, und dadurch auch die partielle Reduktion der RNA-Synthese und der gleichzeitige Beginn der Bildung von DNTP bei der Erniedrigung der GTP- und CTP-Konzentration immer stärker verzögert wird.

Da der Zeitpunkt des Beginns der DNTP-Synthese somit Aufschluß darüber gibt, ob die verzögerte Rifampicinwirkung auf die Bindung des Antibiotikums an die RNA Polymerase während des Vorgangs der Reinitiation zurückzuführen ist, wurde der Verlauf der DNTP-Bildung in Abhängigkeit von der GTP- und CTP-Konzentration bei jeweils konstanten ATP- und UTP-Konzentrationen bestimmt.

Dazu wurde bei 25°C GTP und CTP in den in Fig. 29 angegebenen Konzentrationen gleichzeitig mit der optimalen ATP- und UTP-Menge und Rifampicin zum Komplex aus Enzym und T4 DNA hinzugefügt. Die analog Fig. 28b durchgeführte Analyse der anschließenden DNTP-Synthese ergibt nun, daß die Bildung dieses Moleküls auch bei reduzierten GTP- und CTP-Konzentrationen erst verzögert auftritt. Nach dieser Verzögerungsphase steigt die DNTP-Synthese jeweils rasch an und läuft nach Erreichen der optimalen Bildungsrate mit konstanter Geschwindigkeit ab.

Definiert man nun jeweils den Schnittpunkt des extrapolierten zeitlichen Verlaufs der optimalen DNTP-Bildung mit der Zeitachse als quantitatives Maß der Verzögerungszeit, so zeigt sich, daß im Konzentrationsbereich von GTP und CTP zwischen 600 und 1 µmol/l, in dem die Elongationsgeschwindigkeit drastisch abnimmt (vgl. Ergebnisse, Kap. I.1, Fig 2), die Verzögerungsphase der DNTP-Bildung nicht größer, sondern sogar im Gegenteil etwas geringer wird. (Fig. 29a). Die Syntheserate der anschließenden optimalen DNTP-Bildung bleibt in diesem Konzentrationsbereich nahezu konstant (Fig. 29b). Dies bestätigt, daß die verminderte RNA-Bildung (vgl. Fig. 2) nicht auf die Reduktion der RNA synthetisierenden Enzym-DNA-Komplexe durch die Steigerung der DNTP synthetisierenden Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexe, sondern tatsächlich auf die Verminderung der Elongationsgeschwindigkeit der RNA-Synthese zurück-

zuführen ist. Bei noch kleineren GTP- und CTP-Konzentrationen wird die DNTP-Verzögerungsphase immer kürzer, und die anschließende optimale DNTP-Bildung steigt zusehends an. Bei diesen GTP- und CTP-Konzentrationen lassen sich jedoch aus dem Verlauf der DNTP-Synthese keine Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Rifampicinwirkung ziehen, da in diesem Konzentrationsbereich der Unterschied der DNTP-Bildungsrate in An- und Abwesenheit des Antibiotikums nur sehr gering ist (vgl. Ergebnisse, Kap. I.1 und 2, Fig. 2 und 3).

Die Verringerung der Verzögerungsphase im GTP- und CTP-Konzentrationsbereich zwischen 600 und 1 µmol/l zeigt deutlich, daß an T4 DNA die verzögerte und nur partielle Wirkung von Rifampicin bei Zugabe des Hemmstoffs gleichzeitig mit dem Substrat nicht auf die Bindung des Antibiotikums an freies Enzym während des Vorgangs der Reinitiation zurückgeführt werden kann.

Dies bestätigt die Hypothese, daß der Wirkstoff an langsam initiierende Enzym-DNA-Komplexe bindet und daraufhin seine Wirkung entfaltet. Somit ist anzunehmen, daß die partielle Hemmung der in vitro RNA-Synthese bei der Zugabe von Rifampicin zu Beginn der Reaktion das verschiedenen kinetische Verhalten der binären Enzym-DNA-Komplexe widerspiegelt. Dadurch kommt wohl aber letztlich analog der unterschiedlichen Heparinsensitivität der Enzym-DNA-Komplexe (vgl. Ergebnisse, Kap. III.2b und 3.1) wiederum zum Ausdruck, daß die RNA Polymerase bei der Bildung der binären Komplexe an unterschiedliche Bereiche der Matrize bindet.

2. Wirkung von Rifampicin während verschiedener Stadien der RNA-Synthese

Die vorausgehenden Experimente ergaben, daß bei Zugabe des Antibiotikums erst zu Beginn der RNA-Synthese ein großer Teil der RNA Polymerase wegen der Schutzwirkung der DNA durch die Bildung von RNA unempfindlich gegen die Wirkung des Antibiotikums wird.

Variiert man nun den Zeitpunkt der Rifampicinzubabe in der Weise, daß der Wirkstoff erst zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der RNA-Synthese zugegeben wird, so kommt der stabilisierende Einfluß der RNA um so stärker zur Geltung, je weiter die Reaktion fortgeschritten ist. Wird nämlich der jeweilige Verlauf der Bildung langkettiger RNA nach der Zugabe von Rifampicin zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Reaktion verfolgt, so ergibt sich, daß die weitere RNA-Synthese um so weniger inhibiert werden kann, je später der Hemmstoff zur laufenden RNA-Synthese gegeben wird (Fig. 30). Dabei nimmt

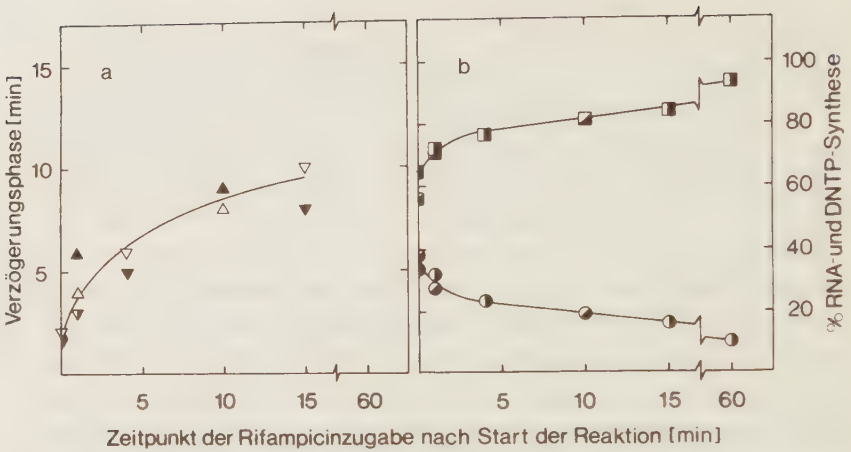


Fig. 30 Einfluß des Zeitpunkts der Zugabe von Rifampicin während der RNA-Synthese an T4 oder T7 D111 DNA

Analog Fig. 28 wurde bei 25°C der zeitliche Verlauf der RNA- und DNTP-Bildung nach Zugabe von Substratlösungen bestimmt, die jedoch kein Rifampicin enthielten. Erst zu den in Fig. 30a und b auf der Abszisse angegeben Zeiten nach Start der RNA-Synthese wurde jeweils in einem Volumen von 5 µl Rifampicin zugesetzt, so daß die Reaktionslösungen je 2 µg/ml Rifampicin enthielten. Fig. 30a zeigt die Abhängigkeit der Zeitdauer nach Rifampicinzugabe, in der noch keine DNTP- Bildung an T4 (▼) und T7 D111 (▲) DNA stattfindet, und in der somit die Synthese von RNA an T4 (▽) und T7 D111 (△) DNA ungehindert ablaufen kann. Die jeweils nach Rifampicinzugabe beobachtete RNA-Restsynthese an T4 (◨) und T7 D111 (◪) DNA (Fig. 30b) wurde jeweils durch graphische Extrapolation der nach längeren Inkubationszeiten beobachteten prozentualen Hemmung der RNA-Synthese (vgl. Einschub von Fig. 28a) auf den Zeitpunkt der Rifampicinzugabe ermittelt. Die nach Rifampicinzugabe jeweils beobachtete optimale DNTP-Syntheserate an T4 (◑) und T7 D111 DNA (◪) wurde auf die identisch bestimmte DNTP-Syntheserate nach Vorinkubation des freien Enzyms mit Rifampicin (vgl. Fig. 28b) bezogen.

sowohl die Zeitdauer, in der die nachfolgende Polynucleotidsynthese unbeeinflußt ablaufen kann (Fig. 30a), als auch das Ausmaß der auch während der gesamten nachfolgenden Inkubationsdauer nur äußerst langsam hemmbaren RNA-Bildung (Fig. 30b) immer mehr zu, je später der Zeitpunkt der Rifampicinzugabe gewählt wurde. Auffällig ist, daß die Zunahme der Stabilisierung der RNA Po-

lymerase durch die Synthese von RNA während der ersten Minute nach Start der Reaktion am größten ist. Dies ist in Einklang mit den schon früher erwähnten Befunden von Chamberlin und Ring (1972), Kerrich-Santo und Hartmann (1974) und Kumar und Krakow (1975), da die Initiation der RNA-Synthese und somit die Stabilisierung des Enzyms durch die Bildung des ternären Komplexes während dieser Anfangsphase am ausgeprägtesten ist.

Entsprechend der verzögerten Abnahme der RNA-Synthese wird der jeweilige Beginn der Bildung von DNTP, der mit dem jeweiligen Zeitpunkt der einsetzenden Inhibierung der RNA-Synthese übereinstimmt, bei der Verlängerung der Zeitspanne zwischen dem Start der Reaktion und der Zugabe von Rifampicin immer stärker verzögert (Fig. 30a). Auch wird die spätere optimale DNTP-Syntheserate, die mit demjenigen Anteil der RNA-Synthese übereinstimmt, der jeweils durch den Hemmstoff relativ rasch inhibiert werden kann, um so geringer, je später das Antibiotikum der laufenden RNA-Bildung zugefügt wurde (Fig. 30b). Dabei ist der stärkste Abfall der späteren optimalen DNTP-Syntheserate wiederum während der ersten Minute nach dem Reaktionsbeginn festzustellen.

Die zunehmende Stabilisierung der binären Komplexe durch die Bildung von RNA in vitro wird auch durch analoge Messungen an der DNA der Deletionsmutante D111 des Phagen T7 bestätigt. Auch an dieser DNA als Matrize wird die RNA Polymerase wiederum durch den Fortgang der RNA-Synthese zunehmend stabilisiert (Fig. 30a,b). So kann die Bildung von RNA auch in diesem Fall um so weniger gehemmt werden, je später das Antibiotikum der Reaktionsmischung zugegeben wurde. Entsprechend nimmt auch die maximale DNTP-Syntheserate um so mehr ab, je größer die Differenz zwischen dem Beginn der RNA-Bildung und der Zugabe des Hemmstoffs ist.

Die Tatsache, daß sowohl an T4 DNA als auch an T7 D111 DNA die Synthese von RNA durch Zugabe von Rifampicin immer weniger gehemmt, und daher auch gleichermaßen die rifampicinabhängige Bildung von DNTP immer unvollständiger induziert werden kann, je weiter die Reaktion fortgeschritten ist, zeigt deutlich, daß die in vitro Synthese von langkettiger RNA die RNA Polymerase entscheidend gegenüber dem Angriff von Rifampicin schützt. Dies bestätigt wiederum, daß das Enzym erst im ternären Komplex weitgehend gegenüber der inhibierenden Wirkung des Antibiotikums stabilisiert ist.

3. Stabilität des isolierten ternären Transkriptionskomplexes gegenüber der Wirkung von Rifampicin

Die Analyse des Verlaufs der in vitro Synthese von RNA und DNTP nach Zugabe von Rifampicin zu verschiedenen Stadien des Reaktionsablaufs verdeutlichte, daß die RNA Polymerase durch die Bildung von RNA im ternären Komplex entscheidend gegenüber der Wirkung des Antibiotikums geschützt wird. Dabei ist der jeweilige rifampicinsensitive Anteil der RNA-Synthese auf nur langsam initiierende Enzym-DNA-Komplexe und nicht auf reinitiierende Enzymmoleküle zurückzuführen.

Um nun die Stabilität der RNA Polymerase gegenüber dem Angriff von Rifampicin während der Elongationsphase unabhängig von nur langsam startenden Enzym-DNA-Komplexen studieren zu können, wurde der ternäre Transkriptionskomplex, bestehend aus Enzym, DNA und wachsender RNA-Kette, durch Gelausschlußchromatographie an Sepharose 4B isoliert [21]. Da der binäre Enzym-DNA-Komplex durch die Bildung von RNA unabhängig von der verwendeten Matrize stabilisiert wird (vgl. Ergebnisse, Kap. V.A.2, Fig. 30), wurde die Bildung des ternären Transkriptionskomplexes mit der wesentlich kleineren DNA der Deletionsmutante D111 des Phagen T7 an Stelle von T4 DNA als Matrize (vgl. Schmidt und Hearst, 1969) durchgeführt, wodurch wegen der klareren Promotorverhältnisse übersichtlichere Bedingungen geschaffen wurden.

Zur Bildung des Elongationskomplexes wurde der binäre Komplex aus RNA Polymerase und T7 D111 DNA bei 25°C und niedriger Ionenstärke für 2 Minuten mit unmarkierten Ribonucleosidtriphosphaten inkubiert. Dabei wurde die Konzentration an ATP mit 100 µmol/l doppelt so hoch wie die der übrigen drei Nuc-

---

21) Die von Rhodes und Chamberlin (1974) und Rohrer und Zillig (1977) beschriebene Trennung des ternären Transkriptionskomplexes von Enzym-DNA-Komplexen, freiem Enzym und nicht umgesetzten Ribonucleosidtriphosphaten durch Gelausschlußchromatographie bietet gegenüber der Isolierung durch Ultrazentrifugation im Rohrzuckergradienten (Bremer und Konrad, 1964; Hayashi, 1965; Richardson, 1966; Schäfer und Zillig, 1973) oder in $CsCl_2$ bzw. $CsSO_4$ (Naito und Ishihama, 1976) den Vorteil, daß die Zeitdauer der Isolierung wesentlich kürzer ist. Auch wird der Komplex mit Hilfe der verwendeten chromatographischen Methode ohne nachträgliche Dialyse frei von Sucrose, $CsCl_2$ oder $CsSO_4$ erhalten.

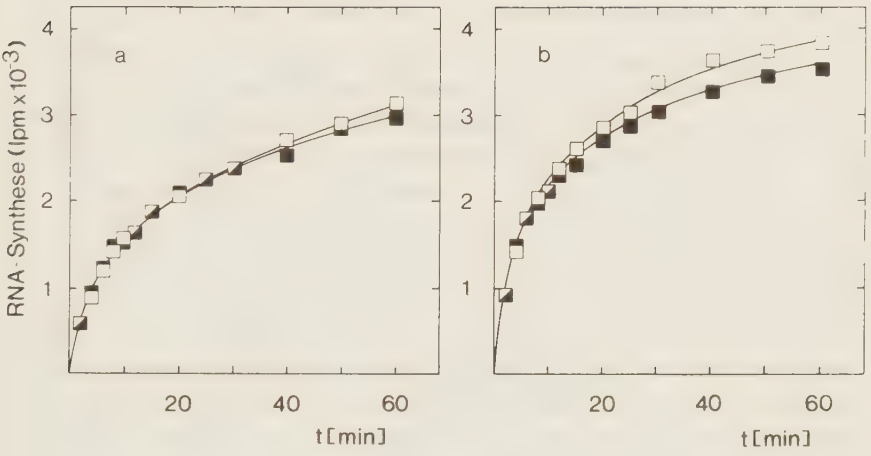


Fig. 31 Einfluß von Rifampicin auf die Elongation des isolierten Transkriptionskomplexes

a. 25°C

In zwei parallelen Ansätzen wurden je 500 µl der Lösung des isolierten Transkriptionskomplexes mit einer optischen Dichte von 0,54 oD/ml (vgl. Methoden, Kap. 3) für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Elongationsreaktion bei 25°C in einem der Ansätze durch Zugabe von 200 µl einer bei 25°C thermostatisierten Substratlösung, die 50 mmol/l KCl, je 1,9 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,38 mmol/l [^{14}C]UTP (40 µCi/µmol) enthielt. Die Elongationsreaktion im andern Ansatz wurde in identischer Weise ebenfalls durch 200 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die zusätzlich zu den angegebenen Komponenten 7 µg/ml Rifampicin enthielt. Somit resultierte jeweils 700 µl Reaktionsmischung, die neben 35 mmol/l Tris HCl-Puffer, pH 7,9/25°C, 3,5 mmol/l 2-Mercaptoäthanol, 7 mmol/l $MgCl_2$, 50 mmol/l KCl, je 0,55 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,11 mmol/l [^{14}C]UTP (40 µCi/µmol) in Anwesenheit von Rifampicin das Antibiotikum in einer Konzentration von 2 µg/ml enthielt. Zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurde je 50 µl der Reaktionsmischung entnommen, und die RNA-Synthese in Ab (□)- und Anwesenheit (■) von Rifampicin bestimmt.

b. 37°C

Die experimentelle Durchführung unterschied sich von der in Fig. 31a nur dadurch, daß alle Operationen nach der Komplexisolierung bei 37°C durchgeführt wurden.

leotide gewählt, damit die Initiation der RNA-Synthese am Promotor A_1 der T7 D111 DNA mit möglichst großer, die Elongation aber nur mit einer lang-

sameren Geschwindigkeit ablaufen kann (vgl. Kramer et al., 1974).

Durch diese Inkubationsbedingungen wird erreicht, daß der weitaus größte Teil der Enzymmoleküle am Ende der zweiminutigen Inkubationszeit als ternärer Elongationskomplex vorliegt. Um den Terminationsvorgang während der nachfolgenden Isolierung zu vermeiden, erfolgte die Chromatographie des gebildeten ternären Komplexes an Sepharose 4B sofort nach dem Abstoppen der Polymerisationsreaktion durch Abkühlen der Inkubationslösung auf $0^{o}C$.

Die Stabilität des isolierten ternären Transkriptionskomplexes gegenüber der Wirkung von Rifampicin bei niedriger Ionenstärke wurde zunächst durch den Einfluß des Antibiotikums auf die weitere Elongation der gereits gebildeten RNA-Ketten nach der erneuten Zugabe aller vier Ribonucleosidtriphosphate in jeweils optimalen Konzentrationen bei 25 und $37^{o}C$ charakterisiert (Fig. 31a,b). Dabei zeigt der nahezu identische Verlauf der Verlängerung der RNA-Ketten, daß der ternäre Transkriptionskomplex sowohl bei $25^{o}C$ als auch bei $37^{o}C$ äußerst stabil ist gegenüber der desaktivierenden Wirkung von Rifampicin [22]. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Messungen von Rhodes und Chamberlin (1974) bei $37^{o}C$ an poly d(A-T) als Matrize. Die ermittelte Stabilität des Transkriptionskomplexes steht andererseits nicht im Gegensatz zu Befunden von Rohrer und Zillig (1977), da diese Autoren den Einfluß des Wirkstoffs auf die Elongation der RNA-Ketten des ternären Komplexes bei $37^{o}C$ an T7 DNA bei hoher Ionenstärke untersuchten.

Es stellte sich zwangsläufig die Frage, ob die Stabilität der RNA Polymerase im ternären Transkriptionskomplex gegenüber Rifampicin an die laufende RNA-Synthese gebunden ist, also die Stabilität erst wieder bei der erneuten Zugabe von Substrat auftritt, oder ob die Stabilität des Enzyms allein auf dessen dauerhaft geschützte Konformation im ternären Komplex zurückgeführt werden kann.

Um ausschließen zu können, daß die Stabilität gegenüber der Wirkung des Antibiotikums eine Eigenschaft darstellt, die lediglich an die ablaufende Elon-

---

22) Dies steht im Gegensatz zu den Befunden von Naito und Ishihama (1975). Diese Autoren führten die beobachtete nur unvollständige Stabilität des Elongationskomplexes auf dessen Dissoziation während der die Isolation im $CsCl_2$-Gradienten abschließenden Dialyse zurück.

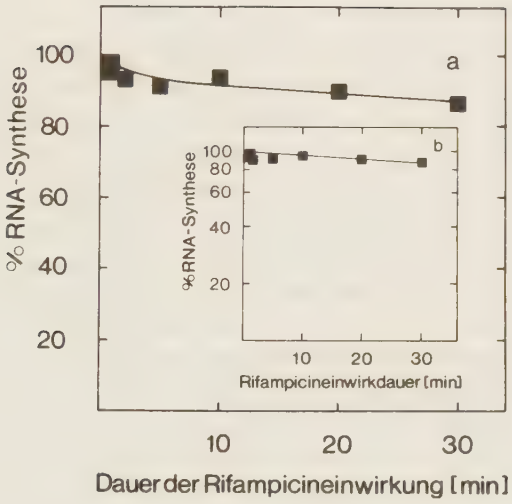


Fig. 32 Stabilität des isolierten Transkriptionskomplexes gegenüber Rifampicin

Je 100 µl der Lösung des isolierten Transkriptionskomplexes mit einer optischen Dichte von 0,49 oD/ml (vgl. Methoden, kap. 3) wurden für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde jeweils 5 µl H_2O zugegeben, und die Inkubation für weitere 10 min bei 25°C fortgesetzt. Danach wurde jeweils 5 µl einer 44 µg/ml Rifampicinlösung zugesetzt, so daß die Rifampicinkonzentration in der Inkubationslösung 2 µg/ml betrug. Nach den auf der Abszisse in Fig. 32a angegebenen Zeiten der Rifampicineinwirkdauer erfolgte der Start der Elongationsreaktion, die bei 37°C durchgeführt wurde, durch Zugabe von 30 µl bei 37°C thermostatisierter Substratlösung, die neben 50 mmol/l KCl je 2,5 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,5 mmol/l [^{14}C]UTP (40µCi/µmol) enthielt. Somit resultierte jeweils 140 µl Reaktionsmischung, die 35 mmol/l Tris-HCl-Puffer, pH 7,9/25°C, 3,5 mmol/l 2-Mercaptoäthanol, 7 mmol/l $MgCl_2$, 50 mmol/l KCl, je 0,71 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,14 mmol/l [^{14}C]UTP(40 µCi/µmol) und 2 µg/ml Rifampicin enthielt. Jeweils 10 min nach Start der Elongationsreaktion bei 37°C wurde je 50 µl der Reaktionsmischung entnommen, und der Einbau von [^{14}C]UMP in RNA (■) bestimmt, der jeweils auf die identisch bestimmte RNA-Synthese in Abwesenheit von Rifampicin (100 % - Wert = 2191 Ipm/10 min) bezogen wurde (Fig. 32a). In Fig. 32b wurde die RNA-Restsynthese halblogarithmisch als Funktion der Rifampicineinwirkdauer vor der Substratzugabe dargestellt.

gationsreaktion gebunden ist, wurde die Stabilität des Transkriptionskomplexes gegenüber der desaktivierenden Wirkung von Rifampicin in Abwesenheit der

Substrate quantitativ bestimmt.

Dazu wurde der isolierte ternäre Komplex bei 25°C zu den in Fig. 32 angegebenen Zeiträumen allein mit Rifampicin inkubiert und erst anschließend zur Bestimmung der verbliebenen Elongationsaktivität für 10 min bei 37°C mit allen vier Ribonucleosidtriphosphaten in optimalen Konzentrationen versetzt. Die so bestimmte Abnahme der Aktivität der RNA Polymerase im ternären Komplex (Fig. 32a) spiegelt quantitativ den Einfluß des Antibiotikums auf den Transkriptionskomplex vor der Substratzugabe wider, da Rifampicin während der anschließenden zehnminutigen Bestimmung der Restaktivität den ternären Komplex nicht angreifen kann (vgl. Fig. 31b). Fig. 32a zeigt, daß die Elongationsaktivität des Transkriptionskomplexes bei der Inkubation mit dem Antibiotikum nur sehr langsam abnimmt. Aus der halblogarithmischen Darstellung (Fig. 32b) läßt sich eine Halbwertszeit der Inaktivierungsreaktion von etwa 3 Stunden errechnen. Dieser Wert stimmt sehr gut mit derjenigen Halbwertszeit überein, durch die der ternäre Komplex auch schon bei der Analyse der Rifampicinwirkung auf die *in vito* Synthese von RNA charakterisiert war (vgl. Ergebnisse. Kap. V.A.1a).

Die nur äußerst langsame Hemmung des isolierten ternären Komplexes auch in Abwesenheit der Substrate zeigt deutlich, daß die Stabilität des ternären Komplexes gegenüber Rifampicin unabhängig von der laufenden Elongationsreaktion ist. Dies bedeutet aber, daß die Stabilität eine dem Transkriptionskomplex inhärente Eigenschaft darstellt und somit in der dauerhaft geschützten Konformation des Enzyms in diesem Komplex begründet ist.

Um die Stabilität des ternären Transkriptionskomplexes mit der des binären Enzym-DNA-Komplexes direkt vergleichen zu können, wurden auch die stabilen binären Enzym-DNA-Komplexe durch Chromatographie an Sepharose 4B isoliert. Bestimmt man in analoger Weise die Stabilität dieser binären Komplexe gegenüber Rifampicin, so sieht man deutlich, daß das Antibiotikum an diese Komplexe weitaus rascher binden kann (Fig. 33). Dabei deckt sich die Geschwindigkeit dieser Inaktivierung weitgehend mit der von Kerrich-Santo und Hartmann (1974) ebenfalls bei 25°C, jedoch an T4 DNA als Matrize bestimmten Desaktivierungsrate der durch Inkubation von Enzym und DNA erhaltenen binären Komplexe. Diese weitgehende Übereinstimmung ist in Einklang mit der Beobachtung von Temple und Rhodes (in Vorbereitung), daß die Stabilität der binären Komplexe unabhängig von der verwendeten Matrize ist.

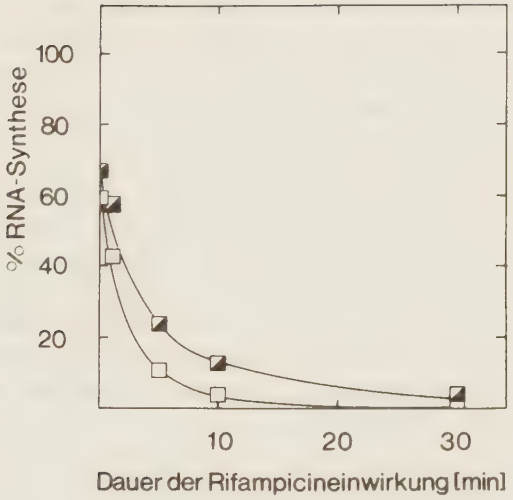


Fig. 33 Stabilität des isolierten Enzym-DNA-Komplexes gegenüber Rifampicin in Ab- und Anwesenheit von ATP und UTP

Der RNA Polymerase-T7 D111 DNA-Komplex wurde analog der Bildung des ternären Transkriptionskomplexes in Abwesenheit von Substrat gebildet und isoliert (vgl. Methoden, Kap. 3). In zwei parallelen Meßreihen wurden je 100 µl dieser Lösung mit einer optischen Dichte von 0,47 oD/ml für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde in die Ansätze der einen Meßreihe jeweils 5 µl H_2O zugegeben, während die Ansätze der zweiten Meßreihe mit 5 µl einer bei 25°C thermostatisierten Substratlösung versetzt wurden, die 1,25 mmol/l ATP und 1,25 mmol/l [^{12}C]UTP enthielt, so daß in den Inkubationsmischungen der zweiten Meßreihe eine ATP- und UTP-Konzentration von je 0,34 mmol/l vorlag. Nach der weiteren Inkubation für 10 min bei 25°C wurde in die Lösungen beider Meßreihen je 5 µl einer 44 µg/ml Rifampicinlösung zugegeben, so daß die Rifampicinkonzentration in den Inkubationsmischungen je 2 µg/ml betrug. Danach wurden zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten der Rifampicineinwirkung die RNA-Elongationsreaktion jeweils analog Fig. 32a durchgeführt. Der jeweilige Einbau von [^{14}C]UMP in RNA im Fall der Rifampicineinwirkung auf den isolierten Enzym-DNA-Komplex in Ab (□)- und Anwesenheit (◪) von ATP und UTP wurde auf die in beiden Testreihen identisch bestimmte RNA-Synthese in Abwesenheit von Rifampicin (100 % - Wert = 609 bzw. 573 Ipm/10 min) bezogen.

Analysiert man die Desaktivierungsrate des isolierten binären Enzym-DNA-Komplexes bezüglich der nachfolgenden RNA-Synthese durch Rifampicin in Anwesen-

heit von ATP und UTP so wird deutlich, daß die Stabilität des binären Komplexes während der kontinuierlichen DNTP-Bildung nur wenig erhöht ist (Fig. 33). Dies deckt sich mit der Beobachtung von Kessler und Hartmann (1977), daß der binäre Enzym-DNA-Komplex durch die Bildung von DNTP nicht dauerhaft vor dem Angriff des Antibiotikums geschützt ist.

Der Vergleich der relativ raschen Desaktivierung des isolierten binären Enzym-DNA-Komplexes auch während der DNTP-Synthese mit der nur äußerst langsamen Hemmung des isolierten ternären Enzym-DNA-RNA-Komplexes zeigt klar, daß im Gegensatz zur Wirkung von Heparin (vgl. Ergebnisse, Kap. III.2b) das Enzym nicht schon während der DNTP-Bildung, sondern erst im ternären Transkriptionskomplex nach der Bildung von RNA dauerhaft gegenüber der Wirkung von Rifampicin geschützt ist. Dies beinhaltet aber darüber hinaus, daß auch die Stabilität der RNA Polymerase gegenüber Rifampicin während der laufenden in vitro Synthese von RNA auf die dauerhaft geschützte Konformation des Enzyms im Transkriptionskomplex zurückgeführt werden muß.

V.B Einfluß von Rifampicin auf die Bindung exogener RNA an freie RNA Polymerase

Die im Vergleich zum binären Enzym-DNA-Komplex weitaus größere Stabilität des Transkriptionskomplexes gegenüber der inhibierenden Wirkung von Rifampicin verdeutlicht, daß die RNA Polymerase erst im ternären Komplex durch die Synthese von RNA fast vollständig geschützt wird. Weiterhin konnten sowohl Lill und Hartmann (1973) als auch Eilen und Krakow (1973) durch Gelchromatographie diese Schutzwirkung der gebildeten RNA darauf zurückführen, daß die Ausbildung einer stabilen Bindung zwischen dem Enzym und Rifampicin im Elongationskomplex weitgehend verhindert wird.

Nun unterbindet nicht nur die entstehende RNA-Kette im ternären Transkriptionskomplex die stabile Bindung von Rifampicin an die RNA Polymerase, sondern es schützt auch schon allein die vorausgehende Bindung exogen zugegebener RNA das Enzym gegenüber dem Angriff des Antibiotikums [23]. So zeigen die

---

23) Es ist schon lange bekannt, daß exogene RNA an freie RNA Polymerase bindet (Richardson, 1966a,b). Da nur wenig mehr als ein Molekül RNA an das Enzym

Untersuchungen von Lill und Hartmann (1973) klar, daß nach der Bindung von isolierter RNA an freie RNA Polymerase das Ausmaß der Anlagerung des Antibiotikums stark herabgesetzt ist. Dies hat seinen Grund darin, daß die Anlagerungsgeschwindigkeit von Rifampicin an das Enzym durch exogene RNA stark verlangsamt wird (Handschin und Wehrli, 1976). Da jedoch nicht nur die Geschwindigkeit der Assoziations-, sondern auch der Dissoziationsreaktion zwischen Rifampicin und RNA Polymerase stark reduziert ist, vermuten diese Autoren, daß die gebundene RNA die Rifampicinbindungsstelle entweder durch direkte sterische Hinderung oder indirekt durch eine allosterische Veränderung der Enzymkonformation weitgehend abschirmt.

Diese Experimente beinhalten aber letztlich, daß die RNA- und Rifampicinbindungsstelle nicht unabhängig voneinander sind, sondern im Gegenteil sich wechselseitig stark beeinflussen.

Es stellte sich nun die Frage, ob diese Wechselseitigkeit auch dadurch zum Ausdruck kommt, daß nicht nur die stabile Bindung von Rifampicin an RNA Polymerase durch die vorausgehende Anlagerung exogener RNA stark beeinflußt wird, sondern daß auch umgekehrt das gebundene Antibiotikum die nachträgliche Anlagerung von RNA deutlich reduzieren kann. Diese Beeinflussung der RNA-Bindung sollte sich darin äußern, daß auch die an die Bindung gekoppelte inhi-

---

assoziiert (Anthony et al., 1969b), ist anzunehmen, daß sich exogene RNA an eine spezifische RNA-Bindungsstelle anlagert. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Bindung von exogener RNA an freie RNA Polymerase auch die Bindung der gebildeten nativen RNA im ternären Transkriptionskomlex beschreibt. Durch diese Bildung des RNA-Enzym-Komplexes wird die katalytische Aktivität der RNA Polymerase bezüglich der Transkription langkettiger RNA inhibiert (Fox et al., 1964; Bremer et al., 1965). Dabei hängt das Ausmaß der Hemmung der RNA-Synthese stark von der Art der verwendeten RNA ab (Tissières et al., 1963; Richardson, 1969; Lill und Hartmann, 1973). Bei der Inkubation von E. coli RNA Polymerase Holoenzym mit einem Überschuß an exogener RNA wird die Untereinheit Sigma freigesetzt (Ruet et al., 1970). Da sigmaabhängige Matrizen wie T4 DNA in Anwesenheit von RNA bei niedriger Ionenstärke nur in geringem Ausmaß transkribiert werden (Bremer et al., 1965; de Robertis et al., 1972), wurde vermutet, daß die inhibierende Wirkung von RNA auf die Ablösung von Sigma zurückzuführen ist. Dies kannjedoch nicht die einzige Ursache der hemmenden Wirkung von RNA darstellen, da auch die RNA-Synthese an sigmaunabhängigen Matrizen wie Kalbsthymus DNA (Fox et al., 1964; Anthony et al., 1969) oder Lachssperma DNA (Lill und Hartmann, 1973) durch exogene RNA inhibiert wird.

bitorische Wirkung exogener RNA durch die vorausgehende Bindung von Rifampicin stark herabgesetzt werden kann.

1. Bindung exogener RNA an RNA Polymerase

Um den Einfluß von exogener RNA auf die katalytische Aktivität der RNA Polymerase festlegen zu können, wurde die Wirkung exogener RNA auf die RNA- und DNTP-Synthese studiert. Dabei wurde gleichzeitig untersucht, welchen Einfluß die Matrize auf die RNA-Wirkung ausübt. Da lösliche RNA aus Hefe (vgl. Material, Kap. 3) sowohl die Aktivität der RNA Polymerase als auch die Bindung von Rifampicin an das Enzym am stärksten inhibiert (Lill und Hartmann, 1973), wurde in den folgenden Experimenten ebenfalls diese RNA-Präparation verwendet.

Weiterhin wurde bei den folgenden Untersuchungen eine geringe Ionenstärke gewählt, da die volle RNA-Wirkung nur bei niedrigen Ionenstärken auftritt (Anthony et al., 1972).

1a. Wirkung von exogener RNA auf die RNA-Synthese

Um die maximale Wirkung der exogenen RNA zu erzielen, mußte zunächst dessen Einfluß auf die Synthese langkettiger RNA bei 25°C untersucht werden. Dazu wurde eine RNA-Konzentration im Vorinkubationsansatz von 250 µg/ml gewählt, da bei dieser Konzentration nahezu 90 % aller Enzymmoleküle inaktiviert werden (Fig. 34a). Wie die Zeitabhängigkeit der RNA-Wirkung zeigt, wird bei 25°C das volle Ausmaß der Inhibierung nicht spontan, sondern erst nach zehnminutiger Inkubation der RNA Polymerase mit exogener RNA erreicht (Fig. 34b).

Analysiert man unter diesen Bedingungen die Wirkung von exogener RNA auf den zeitlichen Verlauf der Synthese langkettiger RNA, so stellt man fest, daß nach der Zugabe von DNA und allen vier Ribonucleosidtriphosphaten zum RNA-Enzymkomplex die nachfolgende RNA-Synthese dauerhaft und in starkem Ausmaß inhibiert wird (Fig. 35a). So wird die Bildung langkettiger RNA während der gesamten Inkubationszeit gleichbleibend nahezu zu 90 % verhindert (Fig. 35b).

Die Tatsache, daß in Gegenwart von exogener RNA auch kein DNTP gebildet wird (ohne Beleg), ist ein Hinweis darauf, daß die exogene RNA nicht nur die Elongation, sondern ebenfalls die Initiation der RNA-Synthese hemmt. Dies wird auch durch den inhibierenden Einfluß der exogenen RNA auf die DNTP-Synthese in Anwesenheit von nur ATP und UTP bestätigt (vgl. Ergebnisse, Kap. V.B.1b).

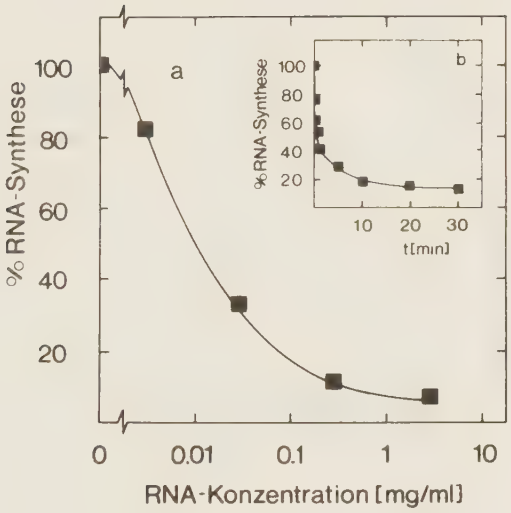


Fig. 34 Dosis- Wirkungs-Kurve exogener RNA

Zu je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym wurde unter Standardbedingungen der RNA-Synthese (vgl. Methoden, Kap. 1a) in der Salzmischung A 0 bis 100 µg lösliche RNA aus Hefe, Typ XI (vgl. Material, Kap. 3) gegeben (result. Vol. je 40 µl), so daß die Vorinkubationslösungen die jeweils auf der Abszisse von Fig. 34a angegebenen RNA-Konzentrationen enthielten. Diese Lösungen wurden für 10 min bei 25°C inkubiert. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte jeweils durch Zugabe von 60 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) und 15,0 µg T4 DNA enthielt. Der jeweils in 25 µl innerhalb von 10 min beobachtete Einbau von [^{14}C]UMP in RNA (■) wurde auf die RNA-Synthese in Abwesenheit von exogener RNA (100 % - Wert = 1229 Ipm/10 min) bezogen (Fig. 34a). In Fig. 34b ist die Abhängigkeit der Aktivität der RNA Polymerase bezüglich des Ausmaßes der anschließenden RNA-Synthese von der auf der Abszisse angegebenen Einwirkdauer von 250 µg/ml exogener RNA während der Vorinkubationsperiode aufgetragen. Als Bezugswert (100 % = 960 Ipm/10 min) diente die RNA-Synthese in Abwesenheit von exogener RNA.

Gibt man jedoch analog Fox et al. (1965) und Bremer et al. (1965) exogene RNA nicht zum freien Enzym, sondern zum Enzym-DNA-Komplex, so wird die RNA-Synthese nur noch in wesentlich geringerem Ausmaß, nämlich nur zu etwa 30 %

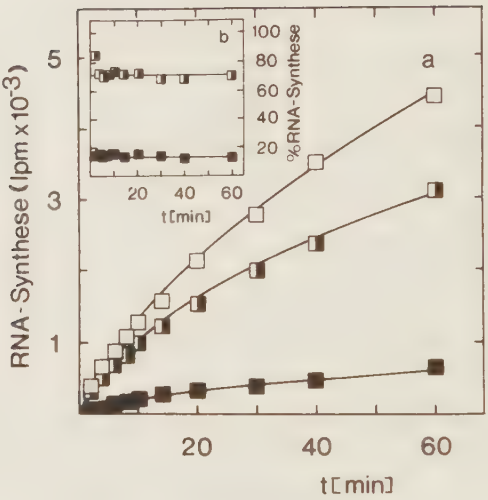


Fig. 35 Einfluß von exogener RNA auf die RNA-Synthese

In einem von drei Ansätzen wurde 6,1 µg RNA Polymerase Holoenzym in der Salzmischung A (vgl. Methoden, Kap. 1a) mit 30,0 µg löslicher RNA aus Hefe, Typ XI (vgl. Material, Kap. 3) versetzt, während in den beiden anderen Ansätzen dem Enzym jeweils 45,0 µg T4 DNA zugegeben wurde. Nach der Inkubation für 10 min bei 25°C wurde dem ersten Ansatz 45,0 µg T4 DNA, dem zweiten 30,0 µg exogene RNA, dem dritten das entsprechende Volumen H_2O zugefügt (result. Vol. je 180 µl). Nach der weiteren Inkubation für 10 min bei 25°C erfolgte der Start der Reaktion bei 25°C durch Zugabe von je 120 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Zu den auf der Abszisse von Fig. 35a angegebenen Zeiten wurde je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen, und der Einbau von [^{14}C UMP]in RNA nach Vorinkubation des freien Enzyms in Abwesenheit von exogener RNA (□) oder in Anwesenheit von exogener RNA vor (■) oder nach (◨) der DNA-Zugabe bestimmt (Fig. 35a). In Fig. 35b wurde das jeweilige Verhältnis der RNA-Synthese in An- und Anwesenheit von exogener RNA (RNA-Zugabe vor DNA-Zugabe (■), RNA-Zugabe nach DNA-Zugabe (◨)) als Funktion der Reaktionsdauer aufgetragen.

gehemmt (Fig. 35a,b). Dies bestätigt, daß die Matrize das Enzym im binären Komplex vor der Wirkung exogener RNA schützt. Richardson (1966) konnte diese Schutzwirkung der DNA darauf zurückführen, daß exogene RNA im Gegensatz zum

freien Enzym an RNA Polymerase im binären Enzym-DNA-Komplex nicht mehr binden kann [24].

Diese dauerhafte Schutzwirkung der Matrize ist ein Hinweis darauf, daß die DNA- und RNA-Bindungsbereiche nicht unabhängig voneinander sind, sondern sich wechselseitig beeinflussen oder teilweise, wenn nicht gar gänzlich übereinstimmen.

1b. Wirkung von exogener RNA auf die DNTP-Synthese

Die Beobachtung, daß bei der Inhibierung der Synthese langkettiger RNA durch exogene RNA kein DNTP gebildet wird, weist darauf hin, daß durch die Bindung von exogener RNA an das Enzym nicht nur der Vorgang der Elongation, sondern ebenfalls der Initiationsprozeß gehemmt wird.

Um direkt zu zeigen, daß auch schon die Initiation langkettiger RNA durch die vorausgehende Zugabe von exogener RNA stark inhibiert wird, wurde die Wirkung exogener RNA auf die Bildung von DNTP studiert.

Dabei ergibt sich, daß die DNTP-Synthese bei 25°C mit ATP und UTP als Substrat durch die vorhergehende Inkubation des freien Enzyms mit exogener RNA zu über 80 % verhindert wird (Fig. 36a). Dies bedeutet aber, daß die Bildung von DNTP nahezu gleich stark wie der Gesamtprozeß der Synthese langkettiger RNA beeinflußt wird. Bestimmt man das jeweilige Ausmaß der Inhibierung, so ergibt sich, daß die Hemmung der DNTP-Bildung zeitlich konstant ist (Fig. 36b).

Gibt man die exogene RNA nicht zum freien Enzym, sondern zum binären Enzym-DNA-Komplex, so ist deutlich zu sehen, daß auch die Inhibierung der DNTP-Synthese durch exogene RNA durch die Matrize weitgehend verhindert wird (Fig. 36a). Dabei zeigt das zeitlich konstante Ausmaß der nur geringen Hemmung, daß auch in diesem Fall der Schutz der DNA dauerhaft ist (Fig. 36b). Dies

---

24) Das zeitlich konstante Ausmaß der nur geringen Hemmung verdeutlicht, daß der Schutz der DNA dauerhaft ist. Dies ist jedoch verständlich, da sowohl der binäre Komplex zwischen DNA und Enzym (So und Downey, 1970; Hinkle und Chamberlin, 1972; Giacomoni, 1976) als auch der ternäre Transkriptionskomplex zwischen RNA, Enzym und T4 DNA (Schäfer und Zillig, 1973) bei niedriger Ionenstärke stabil ist.

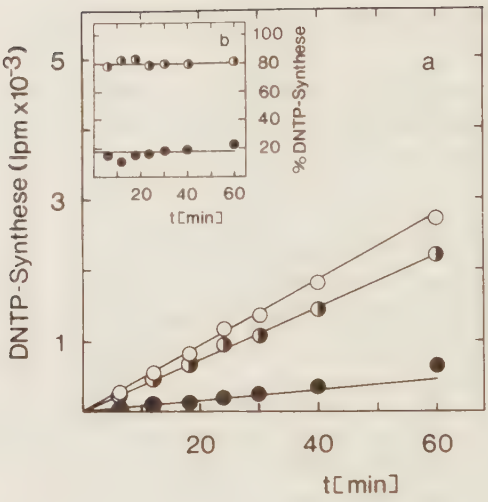


Fig. 36 Einfluß von exogener RNA auf die DNTP-Synthese

Die experimentellen Bedingungen von Fig. 36a waren mit denen von Fig. 35a mit Ausnahme der Änderung identisch, daß die Reaktion bei 25°C jeweils mit einer Substratlösung gestartet wurde, die neben den Standartsalzkonzentrationen lediglich 1,2 mmol/l ATP und 0,8 mmol/l [^{14}C UTP](2µCi/µmol) enthielt. Reihenfolge der Zugabe der exogenen RNA: RNA, DNA (●); DNA, RNA (◑); keine RNA-Zugabe (○). In Fig. 36b wurde analog Fig. 35b das jeweilige Verhältnis der DNTP-Synthese in An- und Abwesenheit von RNA (RNA-Zugabe vor DNA-Zugabe (●); RNA-Zugabe nach DNA-Zugabe (◑)) als Funktion der Reaktionsdauer aufgetragen.

ist jedoch wiederum verständlich, da das Enzym auch bei der DNTP-Synthese bei niedriger Ionenstärke nicht von der Matrize abdissoziiert (vgl. Ergebnisse, Kap. III.2).

Die Beobachtete Hemmung der DNTP-Synthese durch exogene RNA verdeutlicht, daß nicht nur der Vorgang der Elongation, sondern auch der Prozeß der Initiation der RNA-Synthese in ähnlich starkem Ausmaß durch die Bindung der exogenen RNA an die freie RNA Polymerase inhibiert wird. Da diese Bindung der exogenen RNA an die RNA Polymerase durch die vorausgehende Anlagerung des Enzyms an die

Matrize stark reduziert werden kann, liegt es wiederum nahe, daß die Bindungsbereiche der RNA- und DNA-Bindung nicht unabhängig voneinander sind.

2. Einfluß von Rifampicin auf die Bindung von exogener RNA

Die Hemmung sowohl der RNA- als auch der DNTP-Synthese verdeutlichten, daß exogene RNA durch die Bindung an RNA Polymerase nicht nur die Elongation, sondern ebenfalls die Initiation der Synthese langkettiger RNA inhibiert. Somit stellt nicht nur das Ausmaß der Hemmung der RNA-Synthese, sondern auch das der DNTP-Bildung ein Maß für die Bindung exogener RNA an die RNA Polymerase dar. Nun wird zwar der Elongationsablauf der RNA-Synthese durch Rifampicin fast vollständig verhindert (vgl. Ergebnisse, Kap. I.2), jedoch katalysiert die RNA Polymerase in Anwesenheit des Wirkstoffs bei 25°C nahezu unbeeinflußt die Bildung von DNTP (vgl. Ergebnisse, Kap. I.4). Dies eröffnet die Möglichkeit, den Einfluß des Antibiotikums auf die Bindung exogener RNA über das Ausmaß der Hemmung der DNTP-Synthese zu bestimmen, da nur im Fall der Anlagerung der exogenen RNA, nicht aber von Rifampicin die Bildung von DNTP gehemmt wird.

Analysiert man den Einfluß exogener RNA auf die DNTP-Synthese der RNA Polymerase in Gegenwart von Rifampicin, so stellt man überraschenderweise fest, daß die exogene RNA ihre nahezu volle inhibitorische Wirkung nur vor der Bindung des Antibiotikums an das Enzym entfalten kann (Fig. 37a,b).

So beträgt die Hemmung der DNTP-Bildung mit ATP und UTP als Substrat bei der Inkubation des freien Enzyms mit exogener RNA vor der Zugabe von Rifampicin etwa 65 % (Fig. 37b). Diese Inhibierung ist nur wenig geringer als in Abwesenheit des Antibiotikums (vgl. Fig. 36). Wird jedoch die Reihenfolge der Zugabe der beiden Komponenten in der Weise geändert, daß die exogene RNA erst nach der Bindung von Rifampicin an das Enzym zugegeben wird, so beobachtet man, daß die anschließende DNTP-Synthese nur noch wesentlich geringer, nämlich nur zu etwa 30 % inhibiert werden kann (Fig. 37b). Dabei ist die beobachtete Schutzwirkung des Antibiotikums unabhängig davon, ob bei der anschließenden DNTP-Synthese lediglich ATP und UTP oder alle vier Ribonucleosidtriphosphate als Substrat dienen (ohne Beleg).

Inkubiert man den Rifampicin-Enzym-Komplex vor der Zugabe der exogener RNA mit DNA, so ist deutlich sichtbar, daß die Matrize die Schutzwirkung des Antibiotikums noch weiter steigern kann. So beträgt das Ausmaß der Inhibie-

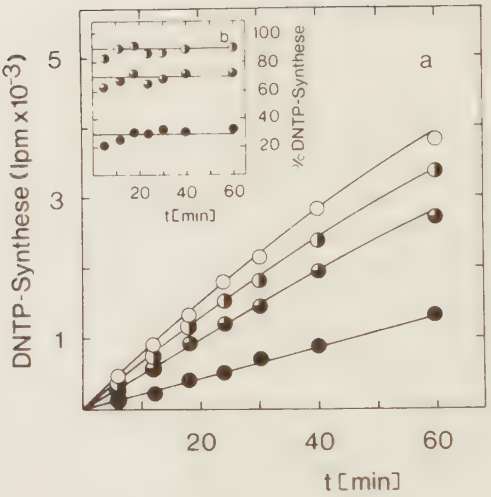


Fig. 37 Einfluß von Rifampicin auf die Wirkung von exogener RNA

In drei von vier parallelen Ansätzen wurde je 4,1 µg RNA Polymerase Holoenzym in der Salzmischung A (vgl. Methoden, Kap. 1b) in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert, während im vierten Ansatz 4,1 µg RNA Polymerase Holoenzym mit 20 µg löslicher RNA aus Hefe, Typ XI (vgl. Material. Kap. 3) ebenfalls für 10 min bei 25°C vorinkubiert wurde. In allen Fällen resultierte ein Volumen von 80 µl. Danach erfolgte in den ersten beiden Ansätzen jeweils die Zugabe von 30,0 µg T4 DNA, während Ansatz 3 mit 20.0 µg RNA, Ansatz 4 mit 0,4 µg Rifampicin versetzt wurde. Nach der weiteren Inkubation jeweils für 10 min bei 25°C erfolgte im Ansatz 1 die Zugabe von H_2O, im Ansatz 2 die Zugabe von 20 µg RNA, in Ansatz 3 und 4 die Zugabe von je 30,0 µg T4 DNA, so daß jeweils ein Volumen von 120 µl entstand. Nach der nochmaligen Inkubation für 10 min bei 25°C erfolgte der Start aller Reaktionen bei 25°C durch Zugabe von je 80 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) enthielt. Zu den auf der Abszisse von Fig. 37a angegebenen Zeiten wurde je 25 µl der Reaktionsmischung entnommen, und der Einbau von [^{14}C]UMP in DNTP bestimmt.

Reihenfolge der Zugabe der exogenen RNA:
RNA, Rifampicin, DNA (●)
Rifampicin, RNA, DNA (◕)
Rifampicin, DNA, RNA (◑)
keine RNA-Zugabe (○)

In Fig. 37b wurde wiederum analog Fig. 35b das Verhältnis der jeweiligen DNTP-Synthese in An- und Abwesenheit von exogener RNA als Funktion der Reaktionsdauer aufgetragen.

rung des Rifampicin-Enzym-DNA-Komplexes durch die exogene RNA nur noch etwa 10 % (Fig. 37b). Dies ist wiederum in Einklang mit den Befunden von Richardson (1966), da schon die DNA allein die RNA Polymerase vor der Bindung exogener RNA schützen kann.

Die im Vergleich zum freien Enzym weitaus geringere Hemmung der DNTP-Synthese, die durch den Rifampicin-Enzym-DNA-Komplex katalysiert wird, zeigt deutlich, daß das Antibiotikum die RNA Polymerase dauerhaft vor der inhibitorischen Wirkung exogener RNA schützt. Dabei schirmt die Matrize das Enzym zusätzlich vor der Hemmung durch exogene RNA ab.

Da aber der hemmenden Wirkung der exogenen RNA die Bindung an das Enzym vorausgehen muß, ist der dauerhafte Schutz darin begründet, daß die Anlagerung der exogenen RNA an die RNA Polymerase durch das gebundene Antibiotikum stark eingeschränkt wird. Dies bestätigt indirekt auch die Befunde von Lill und Hartmann (1973), daß exogene RNA die Bindung von Rifampicin an die RNA Polymerase nicht aufheben kann.

Die beobachtete Kompetition zwischen Rifampicin und exogener RNA bedeutet aber, daß der Schutzeffekt des Antibiotikums letztlich auf die Stabilität des Rifampicin-Enzym-Komplexes zurückgeführt werden muß. Dies erklärt die dauerhafte Schutzwirkung des Antibiotikums, da das Gleichgewicht der Bindung zwischen Rifampicin und der freien RNA Polymerase sehr stark auf der Seite des Rifampicin-Enzym-Komplexes liegt. So beträgt die Gleichgewichtskonstante der Bindung des Wirkstoffs an freie RNA Polymerase bei 25°C 0,32 $\pm$ 0,06 nmol/l (Bähr et al., 1976)

Der Einfluß von Rifampicin auf die Inhibierung der DNTP-Synthese durch exogene RNA zeigte, daß nur der Rifampicin- Enzym-Komplex, nicht aber das freie Enzym weitgehend vor der Hemmung der DNTP-Bildung durch exogene RNA geschützt ist (vgl. Fig. 36 und 37). Somit charaktierisiert der Grad der Hemmung der anschließenden DNTP-Bildung durch exogene RNA ebenfalls das Ausmaß der Bindung von Rifampicin an die RNA Polymerase. Nun war die Hemmung der DNTP-Synthese durch exogene RNA bei der Zugabe des Antibiotikums zum Komplex aus exogener RNA und Enzym nur wenig geringer als die Inhibierung der RNA Polymerase im rifampicinfreien System (vgl. Fig. 36 und 37).

Da also das Ausmaß der Hemmung der DNTP-Synthese durch exogene RNA auch umgekehrt ein Maß für die Anlagerung des Antibiotikums an das Enzym darstellt,

zeigt die im Vergleich zum rifampicinfreien System ebenfalls große Hemmung der DNTP-Bildung nach Zugabe von Rifampicin zum Komplex aus exogener RNA und Enzym in Übereinstimmung mit den Befunden von Lill und Hartmann (1973), daß sich der Wirkstoff nach der Bindung von exogener RNA nur noch in geringem Ausmaß an das Enzym anlagern kann.

Dies verdeutlicht nun, daß nicht nur die Bindung exogener RNA an die RNA Polymerase durch Rifampicin, sondern ebenfalls die Anlagerung des Antibiotikums durch schon gebundene RNA weitgehend verhindert wird. Daraus muß man aber schließen, daß die Bindung von Rifampicin und exogener RNA an RNA Polymerase wechselseitig voneinander abhängig ist. Diese unmittelbare Wechselwirkung legt aber nahe, daß die exogene RNA und das Antibiotikum an denselben Bereich des Enzyms binden, oder daß sich die beiden Bindungsbereiche durch allosterische Wechselwirkung unmittelbar beeinflussen.

3. Spezifität der Schutzwirkung von Rifampicin

Der Einfluß von Rifampicin auf die Wirkung exogener RNA zeigte, daß die Bindung des Antibiotikums und der exogenen RNA wechselseitig voneinander abhängig ist. Dabei wurde vermutet, daß die Bindungsbereiche der RNA Polymerase sowohl für Rifampicin als auch für die exogene RNA entweder sich überlappen oder sich in allosterischer Weise direkt beeinflussen. Diese Deutung verlangt aber, daß die gegenseitige Beeinflussung der beiden Molekülspezies spezifisch ist. Daher wurde die Spezifität der Schutzwirkung von Rifampicin sowohl in Bezug auf das Antibiotikum als auch bezüglich der Art der exogenen RNA untersucht.

3a. Spezifität der Rifampicin-Wirkung

Der Schutz der RNA Polymerase vor der inhibierenden Wirkung exogener RNA durch Rifampicin stellt dann eine spezifische Wirkung des Antibiotikums dar, wenn der Schutzeffekt schon bei kleinen Konzentrationen des Wirkstoffs zu beobachten ist.

Da die RNA-Synthese schon bei einer Rifampicin-Konzentration von 0,1 µg/ml nahezu vollständig blockiert ist (vgl. Ergebnisse, Kap. I.3, Fig. 4), wurde der Einfluß des Antibiotikums auf die inhibitorische Wirkung exogener RNA nicht nur bei der Rifampicin-Konzentration von 2 µg/ml, sondern auch bei der verminderten Konzentration von 0,1 µg/ml untersucht.

Tab. 6 Vergleich der Schutzwirkung von Rifampicin bei verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums

Die experimentellen Bedingungen in Anwesenheit von 2 µg Rifampicin entsprachen denen von Fig. 37 mit der Ausnahme, daß derjenige Inkubationsansatz, bei dem die exogene RNA während der Vorinkubationsperiode erst nach der Zugabe von Rifampicin und DNA zugefügt wurde (Ansatz 2), wegelassen wurde. Die Bestimmung der Wirkung der löslichen RNA aus Hefe, Typ XI (vgl. Material, kap. 3) auf die DNTP-Bildung bei der niedrigeren Rifampicin-Konzentration erfolgte durch identische Versuche in Anwesenheit von 0,1 µg/ml Rifampicin.

Rifampicin-konzentration (µg/ml)	Hemmung der DNTP-Synthese (%) bei Zugabe exogener RNA vor Rif.Bindg.	nach Rif. Bindg.
2	80	25
0,1	81	27

Wie Tab. 6 zeigt, kann die abschirmende Wirkung des Antibiotikums nicht nur bei einer Konzentration von 2 µg/ml beobachtet werden, sondern tritt auch schon bei der geringeren Rifampicin-Konzentration in vollem Umfang auf. So beträgt bei Zugabe der exogenen RNA zum freien Enzym in Gegenwart der kleinen Konzentration des Antibiotikums von 0,1 µg/ml die Hemmung der anschließenden DNTP-Synthese 81 %. Im Gegensatz dazu kann der Rifampicin-Enzym-Komplex auch bei der Rifampicin-Konzentration von 0,1 µg/ml nur zu 27 % inhibiert werden.

Die weitgehende Übereinstimmung der bei den beiden Rifampicin-Konzentrationen jeweils entsprechenden Werte zeigt deutlich, daß die Abschirmung der RNA Polymerase vor der inhibierenden Wirkung exogener RNA eine spezifische Eigenschaft des Antibiotikums darstellt.

3b. Spezifität gegenüber exogener RNA

Bakterielle RNA Polymerasen bilden stabile Komplexe mit den verschiedensten Polyanionen. So bindet das Enzym nicht nur an DNA und RNA (Fox et al., 1965; Richardson, 1966; Jones und Berg, 1966), sondern auch an Heparin (Walter

Tab. 7 Vergleich der Schutzwirkung von Rifampicin gegenüber verschiedenen Polyanionen

Die experimentellen Bedingungen der Bestimmung der jeweiligen Wirkung eines Polyanions auf die DNTP-Bildung entsprachen denen von Fig. 39 mit der Ausnahme, daß wie in Tab. 6 der Inkubationsansatz 2 wegelassen wurde. Die jeweils angegebenen Konzentrationen der Polyanionen entsprechen denjenigen während der Vorinkubationsperiode. Die jeweilige Hemmung der RNA-Synthese durch die verschiedenen Polyanionen (vgl. Material, Kap. 3) wurde analog Fig. 35 bestimmt.

Polyanion	Konzentration (µg/ml)	Hemmung der RNA-Synthese (%)	Hemmung der DNTP-Synthese (%) bei Zugabe des Polyanions vor Rif.Bindg.	nach Rif.Bindg.
lösl.RNA$_{Hefe}$	250	83	80	25
r-RNA$_{E.coli}$	25	75	65	32
R17-RNA	25	73	63	24
poly rA	250	53	44	14
Heparin	250	95	96	96

et al., 1967), Aurintricarboxylsäure (Blumenthal und Landers, 1973), poly (glu, tyr) (Krakow und von der Helm, 1970) und Polyäthansulfonat (Chambon et al., 1967).

Um zu prüfen, ob Rifampicin die RNA Polymerase allgemein vor der Bindung von Polyanionen schützt, oder ob das Antibiotikum spezifisch nur die Anlagerung von exogener RNA dauerhaft verhindert, wurde zunachst der Einfluß von Rifampicin auf die Inhibierung der DNTP-Synthese durch verschiedene Polyribonucleotide untersucht. Dabei wurde die Konzentration der verschiedenen Polyribonucleotide derart gewählt, daß die jeweilige RNA-Synthese in Abwesen-

heit von Rifampicin weitgehend inhibiert wird. Lediglich im Falle von poly rA wurde trotz der unvollständigen Hemmung der RNA-Synthese 250 µg/ml im Vorinkubationsansatz eingesetzt, da auch die weitere Erhöhung der Konzentration von poly rA die Bildung von RNA nicht vollständig inhibiert.

Tab. 7 zeigt, daß der Schutz der RNA Polymerase durch Rifampicin grundsätzlich gegenüber allen untersuchten Polyribonucleotiden besteht. Lediglich das Ausmaß der Schutzwirkung des Antibiotikums ist verschieden. Diese nur graduellen Unterschiede sind wahrscheinlich in der unterschiedlichen Größe und Struktur der verschiedenen Polyribonucleotide begründet (vgl. Lozeron und Szybalski, 1966; Erikson, 1966; Riley et al., 1966).

Untersucht man den Schutz der RNA Polymerase durch Rifampicin jedoch gegenüber dem Polyanion Heparin, so ist klar zu erkennen, daß das Antibiotikum das Enzym vor diesem Polyanion nicht schützen kann (Tab. 7). Dies zeigt, daß der Schutzeffekt von Rifampicin nicht gegenüber allen Polyanionen, sondern lediglich spezifisch gegenüber Polyribonucleotiden besteht.

Einen weiteren Hinweis auf diese Spezifit gibt auch die Beobachtung, daß das Antibiotikum im Gegensatz zur Bindung von exogener RNA die Bildung stabiler Enzym-DNA-Komplexe nicht verhindert (Hinkle et al., 1972).

Die Spezifität der Rifampicinwirkung gegenüber exogener RNA ist nun ein deutlicher Hinweis darauf, daß das Antibiotikum die RNA Polymerase spezifisch vor der Anlagerung von exogener RNA schützen kann. Dies bekräftigt, daß die Bindungsbereiche für Rifampicin und RNA entweder sich überlappen oder sich durch allosterische Wechselwirkung direkt beeinflussen.

4. Stabilität des Rifampicin-Enzym-Komplexes gegenüber exogener RNA

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, daß Rifampicin durch die spezifische Bindung an die RNA Polymerase die Anlagerung von exogener RNA stark einschränkt. Es war nun von Interesse zu erfahren, ob dieser Schutzwirkung des Antibiotikums allgemeine Bedeutung zukommt, oder ob der nur geringe Einfluß der exogenen RNA auf den Rifampicin-Enzym-Komplex lediglich den speziellen Inkubationsbedingungen zuzuschreiben ist. Daher wurde der abschirmende Einfluß von Rifampicin in Abhängigkeit von der Temperatur und der Länge der RNA-Einwirkdauer untersucht.

Dabei diente das Ausmaß der nach der Inkubation der exogenen RNA mit dem

Rifampicin-Enzym-Komplex beobachteten nachfolgenden DNTP-Synthese als Maß für die Stabilität des Komplexes zwischen dem Antibiotikum und dem Enzym gegenüber der Bindung der exogenen RNA.

Um den beobachteten zusätzlichen Schutzeffekt der Matrize weitgehend zu vermeiden (vgl. Fig. 35, 36, 37), wurde bei den folgenden Untersuchungen die DNTP-Bildung nach der Inkubation des Rifampicin-Enzym-Komplexes mit exogener RNA durch die gleichzeitige Zugabe von DNA und Substrat gestartet.

4a. Einfluß der Temperatur

Die nur geringe Reduktion der DNTP-Synthese nach der Zugabe von exogener RNA zum Rifampicin-Enzym-Komplex zeigt, daß das Antibiotikum die Bindung der RNA an das Enzym stark herabsetzt. Dabei legt der Vergleich der Wirkung von exogener RNA in An- und Abwesenheit von Rifampicin nahe, daß der Schutz darauf beruht, daß das Antibiotikum die Anlagerung der RNA durch seine dauerhafte Bindung an das Enzym weitgehend verhindert.

Nun konnte Wehrli (1976) zeigen, daß die Dissoziationsrate des Rifampicin-Enzym-Komplexes stark von der Temperatur abhängt. So ergaben die Messungen, daß sich die Halbwertszeit des binären Rifampicin-Enzym-Komplexes bei der Steigerung der Temperatur von 19 auf 37°C um mehr als das zehnfache erniedrigt. Auch Stender und Scheit (1976) beobachteten eine ähnlich starke Temperaturabhängigkeit der Dissoziation des Komplexes aus RNA Polymerase und einem radioaktiv markierten Rifamycin-Derivat.

Somit sollte auf Grund der geringeren Stabilität des Rifampicin-Enzym-Komplexes der Schutzeffekt des Antibiotikums bei höherer Temperatur weniger ausgeprägt sein. Daher wurde die Wirkung von exogener RNA auf die RNA Polymerase vor und nach der Bindung von Rifampicin an das Enzym auch bei 37°C studiert (Tab. 8).

Der Vergleich mit den entsprechenden Werten bei 25°C ergibt, daß der Schutzeffekt des Antibiotikums auch bei 37°C noch deutlich sichtbar ist. Jedoch ist das Ausmaß der abschirmenden Wirkung von Rifampicin bei der höheren Temperatur geringer als bei 25°C. So zeigt die konstante Reduktion der anschließenden DNTP-Synthese an, daß die exogene RNA bei 25°C innerhalb von 10 Minuten nur 25 %, bei 37°C aber schon 57 % der Rifampicin'enzym-Komplexe inaktiviert. Der Vergleich mit dem Einfluß der exogenen RNA auf die RNA Polymerase in Abwesenheit des Antibiotikums verdeutlicht jedoch, daß auch bei

Tab. 8 Einfluß der Temperatur

Die experimentellen Bedingungen bei 25°C entsprachen denen von Fig. 37 mit der Ausnahme, daß wie in Tab. 6 der Inkubationsansatz 2 weggelassen wurde. Die Bestimmung der Wirkung der löslichen RNA aus Hefe, Typ XI (vgl. Material, Kap.3) auf die DNTP-Bildung bei 37°C erfolgte in der Weise, daß alle Operationen bei 37°C durchgeführt wurden.

Temperatur (°C)	Hemmung der DNTP-Synthese (%) bei Zugabe exogener RNA	
	vor Rif.Bindg.	nach Rif.Bindg.
25	80	25
37	79	57

37°C die reduzierte Empfindlichkeit des Rifampicin-Enzym-Komplexes noch deutlich kleiner als die Empfindlichkeit des freien Enzyms ist.

Die Zunahme der Empfindlichkeit bei Erhöhung der Temperatur bestätigt, daß der Schutz der RNA Polymerase durch das Antibiotikum gegenüber exogener RNA entscheidend durch die Stabilität des Rifampicin-Enzym-Komplexes beeinflußt wird. Dies ist aber ein weiterer Hinweis darauf, daß das Antibiotikum die Anlagerung exogener RNA an das Enzym durch seine Bindung an die RNA Polymerase weitgehend verhindert.

4b. Einfluß der RNA-Einwirkdauer

Da der Schutz der RNA Polymerase gegen exogene RNA durch Rifampicin von der Stabilität des Rifampicin-Enzym-Komplexes beeinflußt wird, sollte das Ausmaß der abschirmenden Wirkung des Antibiotikums auch von der RNA-Einwirkdauer abhängen. Daher wurde der Grad der Schutzwirkung von Rifampicin bei 25°C in Abhängigkeit von der RNA-Einwirkdauer bestimmt.

Dazu wurde der Rifampicin-Enzym-Komplex bei 25°C innerhalb der in Fig. 38 angegebenen Zeiträume mit exogener RNA inkubiert und anschließend zur Bestimmung der verbliebenen Restaktivität für 10 Minuten bei 25°C gleichzeitig mit DNA und Substrat versetzt.

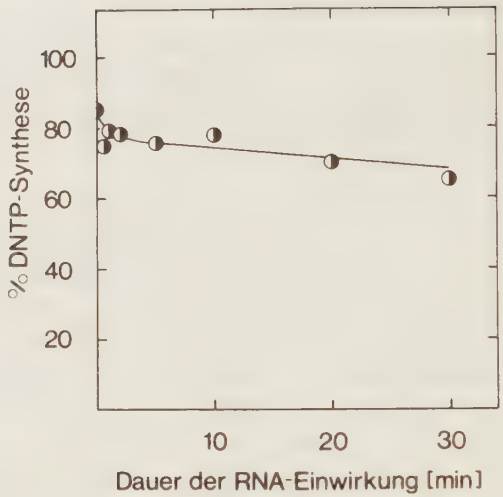


Fig. 38 Stabilität des Rifampicin - RNA Polymerase-Komplexes gegenüber der Wirkung exogener RNA

Je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym wurde in der Salzmischung A (vgl. Methoden, Kap. 1b) in Anwesenheit von 4 µg/ml Rifampicin für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde jeweils 10 µg lösliche RNA aus Hefe, Typ XI (vgl. Material, Kap. 3) zugestzt (result. Vol. je 40 µl), und die Inkubation für die auf der Abszisse angegebenen Zeiten bei 25°C fortgesetzt. Der Start der Reaktion bei 25°C erfolgte durch Zugabe von 60 µl bei 25°C thermostatisierter Substratlösung, die neben den Standardsalzkonzentrationen je 1,2 mmol/l ATP, GTP, CTP und 0,8 mmol/l [^{14}C]UTP (2 µCi/µmol) und jeweils 15,0 µg T4 DNA enthielt. Der jeweilige prozentuale Anteil der RNA-stabilen DNTP-Synthese (◑) wurde auf die DNTP-Synthese in Abwesenheit der exogenen RNA (100 % - Wert = 568 Ipm/10 min) bezogen.

Fig. 38 zeigt, daß etwa 20 % der Rifampicin-Enzym-Komplexe schon innerhalb der ersten Minute durch die zugesetzte exogene RNA gehemmt werden. Der restliche, weitaus größere Anteil der Komplexe wird jedoch auch während der gesamten weiteren Inkubations mit exogener RNA nur sehr langsam angegriffen. Die Halbwertszeit dieser langsamen Inaktivierung beträgt etwa zwei bis drei

Stunden [25]. Diese nur langsame Abnahme der Schutzwirkung von Rifampicin

---

25) Es stellte sich die Frage, ob der zweiphasige Hemmverlauf auf eine Heterogenität in der Präparation der RNA Polymerase zurückzuführen ist oder vielleicht die unterschiedliche Bindung der Enzymmoleküle an verschiedene Bereiche der Matrize während der anschließenden Indikatorreaktion der DNTP-Bildung widerspiegelt. Daher wurde untersucht, ob das Ausmaß des Rifampicinschutzes bei Enzympräparationen unterschiedlichen Sigmagehalts verschieden ist oder von der Art der verwendeten Matrize abhängt.

Tab. 9 Einfluß der Enzympräparation und der Matrize

Die experimentellen Bedingungen entsprachen denen von Fig. 37 mit dem Unterschied, daß in den beiden ersten Ansätzen zwei verschiedene Enzympräparationen mit 100 bzw. 80 %igem Sigmagehalt und T4 DNA , im dritten Ansatz die 100 % sigmagesättigte Enzympräparation und T7 D111 DNA als Matrize verwendet wurde.

Enzympräparation	Matrize	Hemmung der DNTP-Synthese (%) bei Zugabe exogener RNA vor Rif.Bindg.	nach Rif.Bindg.
E_I (100% σ)	T4	80	25
E_{II} (80% σ)	T4	76	24
E_I (100% σ)	T7 D111	81	49

Tab. 9 verdeutlicht, daß die Wahl der Enzympräparation keinen Einfluß auf die Höhe der Schutzwirkung des Antibiotikums ausübt. So ist die Hemmwirkung der exogenen RNA bei den beiden unterschiedlichen Enzympräparationen mit verschiedenem Sigmagehalt fast identisch. Dies läßt vermuten, daß der beobachtete unvollständige Rifampicinschutz nicht auf Unterschiede der Enzymmoleküle zurüchzuführen ist.
Variiert man jedoch die Art der während der anschließenden DNTP-Bildung verwendeten Matrize, so sieht man deutlich, daß das Ausmaß der Schutzwirkung des Antibiotikums durch diesen Parameter beeinflußt wird. So inhibiert die exogene RNA die anschließende Bildung von DNTP an T7 D111 DNA zu 49 %, während die DNTP-Synthese an T4 DNA nur zu 25 % gehemmt wird. Somit liegt es nahe, daß der nur unvollständige Rifampicinschutz auf der Heterogenität der bei der abschließenden DNTP-Synthese verwendeten Matrize zurüchzuführen ist.

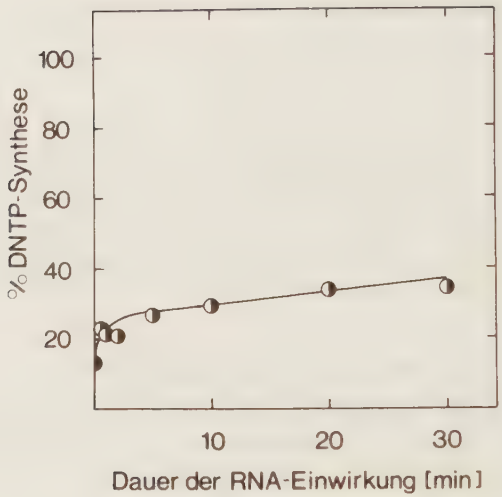


Fig. 39 Stabilität des Komplexes aus exogener RNA und RNA Polymerase gegenüber Rifampicin

Zu je 2,0 µg RNA Polymerase Holoenzym wurde in Salzlösung A (vgl. Methoden, Kap. 1b) 10,0 µg lösliche RNA aus Hefe, Typ XI (vgl. Material, Kap.3) versetzt (result. Vol. je 40 µl), und für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde je 0,2 µg Rifampicin zugegeben und die Inkubation für die auf der Abszisse angegebenen Zeiten bei 25°C fortgesetzt. Der weitere Verlauf der Reaktion entsprach dem von Fig. 38.

prozentualer Anteil der RNA-stabilen DNTP-Synthese (◑)

weist nun wiederum darauf hin, daß die abschirmende Wirkung des Antibiotikums entscheidend auf der Stabilität des Rifampicin-Emzym-Komplexes basiert.

Nun charakterisiert das Ausmaß der DNTP-Synthese nicht nur die Stabilität des Rifampicin-Enzym-Komplexes gegenüber der Inaktivierung durch exogene RNA, sondern ebenfalls die Stabilität des Komplexes aus exogener RNA und Enzym gegenüber dem Angriff des Antibiotikums (vgl. Ergebnisse, Kap. V.B.2). Daher konnte zusätzlich auch die Stabilität der Komplexe aus exogener RNA und Enzym untersucht werden, indem der Grad der DNTP-Bildung nach verschieden langen Inkubationsperioden der Komplexe aus exogener RNA und Enzym mit

Rifampicin wiederum durch die gleichzeitige Zugabe von DNA und Substrat bestimmt wurde (Fig. 39). Der Verlauf der Zeitabhängigkeit der Rifampicineinwirkung zeigt, daß auch in diesem Fall schon innerhalb einer Minute etwa 20 % der RNA-Enzymkomplexe durch das Antibiotikum angegriffen werden kann, während der restliche Anteil sich wiederum als äußerst stabil gegenüber der Bindung des Wirkstoffs erweist. Die Halbwertszeit dieser langsamen Bindung beträgt etwa zwei bis drei Stunden. Auffällig ist, daß die Stabilität dieses vorherrschenden Anteils der Komplexe aus exogener RNA und Enzym gegenüber Rifampicin mit der Stabilität der Rifampicin-Enzym-Komplexe gegenüber exogener RNA übereinstimmt (vgl. Fig. 38 und 39). Diese identische Beeinflussung ist ein Hinweis darauf, daß sowohl das Antibiotikum als auch die exogene RNA sich entweder durch die Bindung an denselben Bereich der RNA Polymerase oder durch allosterische Wechselwirkung direkt beeinflussen.

Diese enge Beziehung zwischen Rifampicin und RNA wurde auch bei der Analyse der Wirkung des Antibiotikums auf die *in vitro* Synthese langkettiger RNA beobachtet (vgl. Ergebnisse, Kap. V.A). So wird die dauerhafte Stabilität der RNA Polymerase erst durch die Bildung von RNA im ternären Transkriptionskomplex erreicht (vgl. Ergebnisse, Kap. V.A.2,3). Dabei ist die Stabilität des ternären Transkriptionskomplexes gegenüber der Bindung von Rifampicin mit der des stabilen Anteils der Komplexe zwischen exogener RNA und RNA Polymerase nahezu identisch (vgl. Fig. 32 und 38). Diese übereinstimmende Stabilisierung der RNA Polymerase durch exogene RNA und RNA im ternären Transkriptionskomplex ist ein direkter Hinweis darauf, daß die Wirkung von *in vitro* synthetisierter RNA gegenüber Rifampicin durch den Einfluß exogen zugegebener RNA beschrieben werden kann. Dies legt aber nahe, daß auch umgekehrt die weitgehende Blockierung der Bindung exogener RNA an die RNA Polymerase durch Rifampicin die Wirkung des Antibiotikums im ternären Transkriptionskomplex widerspiegelt.

Somit wird die *in vitro* Synthese langkettiger RNA durch Rifampicin dadurch inhibiert, daß das Antibiotikum die Bindung von Ribonucleinsäure an den Bindungsbereich des RNA Polymerase-DNA-Komplexes für das RNA-Produkt verhindert. Dies hat zur Folge, daß die Elongation des initiierenden Dinucleosidtetraphosphats zu langkettiger Ribonucleinsäure nicht mehr möglich ist.

Abschließende Aspekte

Die DNTP-Bildung als Modellreaktion der Initiation langkettiger RNA

Ein wichtiges Element der Regulation der Genexpression ist die Steueuerung der Transkription auf der Stufe der Initiation. So kann E. coli RNA Polymerase in vitro die RNA-Synthese selektiv an einer Vielzahl von Promotoren auf Matrizen bakteriellen und viralen Ursprungs initiieren (vgl. Gilbert, 1976). Nun ist es bei dieser komplexen Reaktion nicht verwunderlich, daß viele Faktoren die Initiation der Transkription durch bakterielle RNA Polymerasen beeinflussen. So üben nicht nur Reaktionsparameter wie Temperatur (Miller und Burgess, 1978), mono- und divalente Kationen (Chamberlin und Ring, 1972; Nakanishi et al., 1975) und die Enzymkonzentration (Stahl und Chamberlin, 1977), sondern auch zusätzliche Proteinfaktoren (vgl. Gilbert, 1976; Losick und Pero, 1976) einen bestimmenden Einfluß auf die Initiation der RNA-Synthese aus.

Eine Vielzahl von Untersuchungen begründen nun die Vorstellung, daß die Steuerung der Initiation der RNA-Bildung dadurch erreicht wird, daß mehrere einander folgende Reaktionsschritte in einer bestimmten Reihenfolge ablaufen müssen. So beinhaltet die spezifische Initiation die Erkennung bestimmter Promotorregionen der Matrize durch freie RNA Polymerase, die Bildung des spezifischen Komplexes zwischen RNA Polymerase Holoenzym und der Matrize und die eigentliche katalytische Reaktion der Initiation der RNA-Synthese, bei der das initiierende Purin-Ribonucleosidtriphosphat mit dem zweiten Nucleotid durch eine Phosphodiesterbindung verknüpft wird (vgl. Chamberlin, 1976).

Schon Walter et al. (1967) postulierten auf Grund eines der eigentlichen katalytischen Reaktion vorgelagerten, stark von der Temperatur und der Io-

nenstärke abhängigen geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritts, daß der Einfluß der verschiedenen Reaktionsparameter auf die Initiation der Transkription vornehmlich auf die Einstellung eines der Substratanlagerung vorgelagerten Gleichgewichts zweier unterschiedlicher Zustandsformen des Praeinitiationskomplexes zurückgeführt werden kann.

Die Existenz eines solchen Gleichgewichts konnte nun dadurch nachgewiesen werden, daß sich die beiden Zustandsformen des Praeinitiationskomplexes durch ihre Eigenschaften stark unterscheiden. So sind die beiden Zustandsformen nicht nur durch eine verschiedene Stabilität gekennzeichnet (Hinkle und Chamberlin, 1972), sondern initiieren auch die RNA-Synthese mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (Kerrich-Santo und Hartmann, 1974; Mangel und Chamberlin, 1974a). Am deutlichsten jedoch können die beiden Zustandsformen auf Grund ihrer verschiedenen Sensitivität gegenüber Inhibitoren der RNA Polymerase wie Rifampicin (Sippel und Hartmann, 1970; Kerrich-Santo und Hartmann, 1874), Heparin (Zillig et al., 1970; Schäfer et al., 1973) oder poly I (Bautz et al., 1972) unter Reaktionsbedingungen wohl unterschieden werden, die eine kinetische Kontrolle der Anlagerung des Hemmstoffs während des Ablaufs der Initiation garantieren.

Die Einstellung dieses der eigentlichen katalytischen Reaktion vorgelagerten Gleichgewichts ist an stark sigmaabhängigen Matrizen (Burgess et al., 1969) von der Bindung der Untereinheit Sigma an die RNA Polymerase abhängig (Bautz und Bautz, 1970; Zillig et al., 1970). Dabei legen die Untersuchungen von Zillig et al. (1970) und Mangel und Chamberlin (1972) nahe, daß die nur langsam initiierende Zustandsform des Holoenzym-DNA-Komplexes nicht nur mit freiem Holoenzym, sondern ebenfalls mit freiem und matrizengebundenem Coreenzym im Gleichgewicht steht.

Auch wird die Bildung des spezifischen Praeinitiationskomplexes in Abwesenheit von Substrat entscheidend durch die Reaktionsparameter Temperatur (Lill et al., 1970; Zillig et al., 1970; Bautz et al., 1972; Dausse et al., 1972; Kerrich-Santo und Hartmann, 1974; Mangel und Chamberlin, 1974c; Escarmis et al., 1975; Surzycki et al., 1976), monovalente (Schäfer et al., 1973; Kerrich, 1973; Mangel und Chamberlin, 1974b; Domingo et al., 1975) und divalente (Lill et al., 1970; Kerrich-Santo und Hartmann, 1974) Kationen beeinflußt. So läßt sich aus der Temperaturabhängigkeit der Einstellung des Gleichgewichts eine Aktivierungsschwelle von 130 kJ/mol=31 kcal/mol

für die Bildung des stabilen Praeinitiationskomplexes berechnen (vgl. Mangel und Chamberlin, 1974c und Ergebnisse, Kap. II.1, Anm. 8).

In Anwesenheit aller vier Ribonucleosidtriphosphate wird die Einstellung dieses vorgelagerten Gleichgewichts zusätzlich durch die Weiterreaktion des Praeinitiationskomplexes in die Elongationsphase der RNA-Synthese stark verschoben (Kerrich-Santo und Hartmann, 1974) [26].

---

26) Es ist eine allgemein akzeptierte Vorstellung, daß die Aktivierung des Praeinitiationskomplexes mit einem lokalen Aufschmelzen der Matrize verbunden ist. So schlossen Saucier und Wang (1972) aus der Veränderung der Superhelizität kovalent geschlossener DNA bei der Bildung des Enzym-DNA-Komplexes, daß die Bindung von RNA Polymerase an die Matrize ein begrenztes Aufschmelzen der DNA zur Folge hat. Diese Konformationsänderung der Matrize ist durch einen sigmoiden Kurvenverlauf der Temperaturabhängigkeit gekennzeichnet (Wang et al., 1977) und wird durch negative Superhelizität der DNA begünstigt (Wang, 1974; Richardson, 1975). Auch wurde die Tatsache, daß die Methylierung von Adenosinresten von T7 DNA in Position 1 mit Dimethylsulfat erst durch die Bindung des Enzyms an die Matrize möglich wird, durch ein Aufschmelzen der DNA gedeutet (Melnikova et al., 1978). Dies ist in Einklang mit Befunden von Lawley und Brookes (1963), da die Methylierung von Adenosinresten in N1-Position im Gegensatz zur N3-Position erst in Einzelstrangbereichen von DNA möglich ist. Ebenfalls wurde die begrenzte Formylierung der DNA mit Formaldehyd (von Hippel und Wong, 1971; Dean und Lebowitz, 1971; Kosaganov et al., 1971; Zarudnaya et al., 1976), die hypochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums der DNA (Hsieh und Wang, 1978), der Austausch von [^{3}H]-Protonen mit DNA (Teitelbaum und Englander, 1975), die Abnahme der Bindung des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (Jovin und Scheit, 1975) und die Aktivierung verschiedener Promotoren durch organische Reagentien (Nakanishi et al., 1974, Travers, 1974) bei der Bindung des Enzyms an die Matrize direkt auf die Veränderung der Helixstruktur der DNA zurückgeführt. Siebenlist (1979b) konnte kürzlich am Beispiel des A_3-Promotors von T7 DNA zeigen, daß das partielle Aufschmelzen von etwa 10^3 Basenpaaren bei der Bildung des spezifischen Praeinitiationskomplexes tatsächlich in dem Bereich des Promotors erfolgt, der sowohl die RNA-Startstelle als auch eine Teil der von Pribnow (1975) postulierten Bindungsregion des Promotors für die RNA Polymerase enthält.
Nun sprechen andere Beobachtungen dafür, daß sich nicht nur die Konformation der Matrize, sondern ebenfalls die der RNA Polymerase bei der Bildung des stabilen Praeinitiationskomplexes ändert. So wird die Stabilität des Enzyms gegenüber hohen Salzkonzentrationen und hohen Temperaturen bei der Bindung an die DNA erhöht (Khesin et al., 1967; Nikoforov, 1970). Auch nimmt bei diesem Prozeß die Sensitivität des Enzyms gegenüber dem proteolytischen Abbau durch Proteasen ab (Lill und Hartmann, 1975). Veränderungen in der Konformation der RNA Polymerase werden auch durch die gegenüber der Anlagerung von Coreenzym an die DNA veränderte Temperaturabhängigkeit der optischen Rotationsdispersion bei der Bildung des Holoenzym-DNA-Komplexes

Nun wird auch das Ausmaß der DNTP-Bildung durch einen der eigentlichen katalytischen Reaktion vorgelagerten Reaktionsschritt entscheidend beeinflußt (vgl. Ergebnisse, Kap. III.3).

So zeigt die Reversibilität der Aktivierung inaktiver Zustandsformen des Enzym-DNA-Komplexes deutlich, daß es sich bei diesem vorgelagerten Reaktionsschritt um ein Gleichgewicht zwischen zwei Zustandsformen des RNA Polymerase Holoenzym-DNA-Komplexes handeln muß (Fig. 23). Dabei sind die beiden im Gleichgewicht stehenden Zustansformen des Enzym-DNA-Komplexes wiederum nicht nur durch ihre verschiedene Sensitivität gegenüber dem Hemmstoff Heparin gekennzeichnet (Tab. 3; Fig. 22, Kurve a), sondern unterschieden sich auch in der Fähigkeit, die DNTP-Synthese zu katalysieren (Fig. 22, Kurve b). So zeigt der Einfluß der Temperatur auf den Anteil der aktiven Zustandsform der Enzym-DNA-Komplexe (Fig. 22, Kurve b), daß nur die bei Temperaturen oberhalb 20°C vorherrschende Zustandsform die Synthese von DNTP katalysieren kann.

Die weitgehende Übereinstimmung des sigmoiden Verlaufs der Temperaturabhängigkeit des Anteils der aktiven, gegenüber Heparin stabilen Enzym-DNA-Kom-

---

nahegelegt (Novak und Doty, 1970). Ebenso weisen Fluoreszensmessungen von Wu und Wu (1973) auf eine Konformationsänderung des Enzyms bei dessen stabilen Bindung an die Matrize hin. Die Bedeutung der Enzymkonformation wird indirekt auch dadurch unterstrichen, daß sich die Einstellung des Gleichgewichts nicht nur bei Matrizen aus unterschiedlichen Organismen (Escarmis et al., 1975) und den verschiedenen Promotoren einer Matrize (Dausse et al., 1976; Surzicki et al., 1976) unterschiedet, sondern ebenfalls von der Struktur der RNA Polymerase abhängig ist. Dies kommt dadurch zum Ausdruck, daß sich die Temperaturabhängigkeiten an identischen Matrizen bei der Bindung von RNA Polymerasen aus taxonomisch verschiedenen Bakterienklassen unterscheidet(Remold-O'Donnel und Zillig, 1970). Auch wirken sich die Veränderungen der RNA Polymerase bei der T4-Infektion entscheidend auf die Bildung des stabilen Enzym-DNA-Komplexes aus (Khesin et al., 1976; Baralle und Travers, 1976). Zusätzlich ist bemerkenswert, daß sich auch die Geschwindigkeit der spezifischen Komplexbildung nicht nur durch die Struktur des Promotors (Stahl und Chamberlin, 1977; Seeburg et al., 1977; von Gabain und Bujard, 1977; 1979), sondern wiederum auch durch die Art der bindenden RNA Polymerase bestimmt wird (Wiggs et al., 1979).
All diese Argumente legen nahe, daß bei der Einstellung des der eigentlichen katalytischen Reaktion vorgelagerten Gleichgewichts nicht nur die Konformation der Matrize, sondern auch die Struktur des gesamten Enzym-DNA-Komplexes geändert wird.

plexe sowohl bei der Initiation der RNA-Synthese (Zillig et al., 1970) als auch bei der Bildung von DNTP nach der Bindung von Rifampicin an die RNA Polymerase (Fig. 22) begründet nun die Vorstellung, daß beide Reaktionen durch dasselbe, den eigentlichen katalytischen Reaktionsschritten vorgelagerte Gleichgewicht zweier Zustandsformen des Enzym-DNA-Komplexes gesteuert wird.

Diese Übereinstimmung des reaktionsbestimmenden Schrittes wird dadurch unterstützt, daß sich das Ausmaß der Katalyse sowohl der Bildung von DNTP als auch der Initiation langkettiger RNA an durch die Untereinheit Sigma nur wenig stimulierbaren Matrizen wie Lachssperma oder Kalbsthymus DNA (Burgess et al., 1969) nicht signifikant unterscheidet (Fig. 15b). Jedoch werden beide Reaktionen an sigmaabhängigen Matrizen wie T4 oder λb2 DNA durch die Anwesenheit dieser Untereinheit stark stimuliert (Fig. 16.A; Johnston und McClure, 1976; Burgess et al., 1969).

Gleichermaßen erklärt die Identität des Reaktionsschrittes, der das Ausmaß beider Reaktionen steuert,auch die übereinstimmend hohe beobachtete Arrhenius'sche scheinbare Aktivierungsenthalpie an T4 DNA sowohl der DNTP (ΔE_{obs}=110kJ/mol=26kcal/mol) als auch der RNA-Synthese (ΔE_{obs}=23kcal/mol= 96kJ) (vgl. Fig. 10; Walter et al., 1967), die an T4 DNA eine ähnliche Temperaturabhängigkeit beider Reaktionen (vgl. Fig. 9a,10 und 9b) zur Folge hat.

Ebenfalls wird durch diese Identität die nicht nur an der DNA des Phagen T4, sondern auch des Phagen λ als Matrize beobachtete starke Reduktion sowohl der Bildung von DNTP (Fig. 12a; McClure et al., 1978) als auch der Initiation langkettiger RNA (Milette et al., 1970; Miller und Burgess, 1978) bei hohen Ionenstärken verständlich, da ja das Gleichgewicht im Falle der RNA-Synthese bei Erhöhung der Ionenstärke immer mehr auf die Seite der nur langsam initiierenden, labilen Zustandsform des Praeinitiationskomplexes verschoben wird (vgl. S. 158). Auch zeigt der Einfluß der divalenten Magnesium-Ionen auf die Lage des vorgelagerten Gleichgewichts (vgl. S. 158) daß die beobachtete Magnesiumabhängigkeit der DNTP-Synthese (McClure et al., 1978) nicht allein auf die Komplexbildung der sich anlagernden Substrate zurückgeführt werden kann. Weiterhin ist zu vermuten, daß die Einstellung des der eigentlichen katalytischen Reaktion vorgelagerten Gleichgewichts auch von der Protonenkonzentration abhängig ist und somit zumin-

dest teilweise die starke pH-Abhängigkeit der DNTP- und RNA-Synthese verursacht (vgl. Fig. 11a,b).

Die Identität des Reaktionsschritts, der das Ausmaß sowohl der Bildung von DNTP als auch der Initiation der Synthese langkettiger RNA regelt, ist in Einklang mit der Vorstellung, daß beide Reaktionen durch das gleiche aktive Zentrum katalysiert werden. Dies ist aber ein deutlicher Hinweis darauf, daß beide Reaktionsabläufe bis zur Ablösung des DNTP-Produkts identisch sind.

Jedoch ist die Weiterreaktion nach der DNTP-Bildung auf zwei parallelen Reaktionswegen möglich:

1. Abdissoziation des Initiationsprodukts
2. Elongation des gebildeten DNTP mit weiteren Ribonucleosidtriphosphaten zu längeren Oligonucleotiden

Die partielle Übereinstimmung der beiden parallelen Reaktionwege bis einschließlich zur Knüpfung der ersten Phosphodiesterbindung erklärt die entgegengesetzte Abhängigkeit der Bildung von DNTP und langkettiger RNA (vgl. Fig.1,2), da durch die erst späte Verzweigung der beiden Reaktionswege bei der Bildung eines Reaktionsprodukts die Bildung des anderen ausgeschlossen ist.

Die Temperaturabhängigkeit der Bildung der gegenüber Heparin stabilen Enzym-DNA-Komplexe während der kontinuierlichen Bildung von DNTP stimmt mit der schon in Abwesenheit von Substrat gefundenen Temperaturabhängigkeit weitgehend überein. Daraus kann man folgern, daß die Einstellung des reaktionsbestimmenden vorgelagerten Gleichgewichts zwischen den beiden Zustandsformen des Praeinitiationskomplexes durch den vollständigen Ablauf des ersten Reaktionsweges, also dem der DNTP-Bildung, nicht wesentlich verschoben wird.

Im Gegensatz dazu wird die Einstellung dieses Gleichgewichts durch den Ablauf der parallelen Elongationsreaktion des initiierenden DNTP zu längeren RNA-Ketten empfindlich gestört, da dadurch der Initiationskomplex in den ternären Transkriptionskomplex übergeht (vgl. Ergebnisse, Kap. I.4).

Sieht man einmal von der Transkription ausschließlich dA/dT-haltiger Anfangssequenzen und der Bildung AMP- und UMP-haltiger Homopolymeren ab (vgl.

Ergebnisse, Kap. I.4, Anm. 5), so ist bei optimalen ATP- und UTP-Konzentrationen im Gegensatz zur Abdissoziationsreaktion des Initiationsprodukts lediglich diese Weiterreaktion des initiierenden DNTP zu längeren Oligoribonucleotiden von der Anwesenheit der für die Elongationsreaktion essentiellen Ribonucleosidtriphosphate GTP und CTP abhängig (vgl.auch Rhodes und Chamberlin, 1974). Dadurch wird verständlich, daß das relative Verhältnis der Syntheseraten der beiden parallelen Reaktionen stark von der GTP- und CTP-Konzentration abhängt, da bei der Erhöhung der Konzentration dieser beiden Ribonucleosidtriphosphate durch den zunehmenden Ablauf der Oligoribonucleotidsynthese immer mehr Enzym-DNA-Komplexe in die Elongationsphase übergehen und somit für die DNTP-Bildung nicht mehr zur Verfügung stehen [27].

So erreicht die Bildung des Dinucleosidtetraphosphats pppApU bei optimalen ATP- und UTP-Konzentrationen erst in Abwesenheit von GTP und CTP ein Maximum (Fig. 1b, 2), da in diesem Fall die Geschwindigkeit der GTP- und CTP-abhängigen Elongationsreaktion sehr gering wird (Fig. 1a,2). Demgegenüber wird die Reaktionsgeschwindigkeit der parallelen Elongationsreaktion bei der Erhöhung der GTP- und CTP-Konzentration immer höher. Dies hat zur Folge, daß unter diesen Bedingungen die RNA-Synthese stark zunimmt (Fig. 1a,2), während der Reaktionsweg der DNTP-Synthese nur noch in äußerst geringem Umfang beschritten wird (Fig. 1b,2). Dabei reduzieren die Ribonucleosidtriphosphate GTP und CTP die Bildung von pppApU schon in geringsten Konzentrationen so deutlich, daß die pppApU-Synthese bei hohen Konzentrationen selbst an hochgereinigtem ATP und UTP wahrscheinlich auf Grund von Spuren an verunreinigendem GTP und CTP nicht optimal ablaufen kann (Fig. 7a; 8a,b). Jedoch

---

27) Jedoch scheint das relative Verhältnis der Geschwindigkeiten beider parallelen Reaktionen auch von der Art der Matrize abhängig zu sein, da bei Inkubation mit nachgereinigtem ATP und UTP als Substrat bei 25°C an T4, T7 D111 und λb2 DNA (Fig. 9a, 9b; Tab. 4; McClure und Cech, 1978) eine leichte Erhöhung , an T7 DNA unter identischen Bedingungen (Tab.5) jedoch eine leichte Erniedrigung der DNTP-Syntheserate durch Rifampicin bewirkt wird. Ebenso ist zu vermuten, daß dieses relative Verhältnis von der Art der RNA Polymerase abhängig ist, da Rifampicin bei 25°C unter gleichen Bedingungen die Katalyse der DNTP-Synthese durch E. coli RNA Polymerase leicht erhöht, diejenige durch RNA Polymerase aus Micrococcus luteus jedoch erniedrigt (S. Lechner, Dissertation).

ist nicht auszuschließen, daß durch die Synthese von Homopolymeren oder die Transkription ausschließlich dA/dT-haltiger Anfangssequenzen der in vitro transkribierten Abschnitte der T4 DNA die Anzahl von DNTP synthetisierenden Initiationskomplexen ebenfalls vermindert wird (vgl. Ergebnisse, Kap. I.4, Anm. 5).

Es bleibt aber festzuhalten, daß beide Reaktionswege prinzipiell bei allen untersuchten GTP- und CTP-Konzentrationen, wenn auch in stark unterschiedlichem Ausmaß, ablaufen können ((vgl. Ergebnisse, Kap. I.1).

Diese Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den beiden Zustandsformen des Enzym-DNA-Komplexes durch die zur Abdissoziation des initiierenden DNTP parallelen Elomgationsreaktion zu längeren Polyribonucleotiden kann nun durch die spezifische Bindung des Antibiotikums Rifampicin an die RNA Polymerase nahezu quantitativ blockiert werden (Hartmann et al., 1967; Ergebnisse, Kap. 2,3). So inhibiert der Hemmstoff selbst bei hohen Konzentrationen aller vier für den Gesamtablauf der RNA-Bildung essentiellen Ribonucleosidtriphosphate fast vollständig die Elongation des initiierenden DNTP zu langkettiger RNA (Fig. 3). Dies kommt dadurch deutlich zum Ausdruck, daß die RNA Polymerase nach der Anlagerung des Wirkstoffs selbst die Bildung von Trinucleosidpentaphosphat nicht mehr katalysieren kann (vgl. Ergebnisse, Kap. I.2; IV.2; Johnston und McClure, 1976; McClure und Cech, 1978).

Diese Blockierung der zur Abdissoziation des initiierenden DNTP parallelen Bildung von Oligoribonucleotiden, die bei 25°C selbst bei der Inkubation des Enzym-DNA-Komplexes allein mit hochgereinigtem ATP und UTP als Substrat noch in geringem Umfang abläuft (Fig. 1,2), hat eine Steigerung der pppApU-Bildungsrate durch Rifampicin zur Folge (vgl. Ergebnisse, Kap. I.4; Kessler und Hartmann, 1977; McClure und Cech, 1978). Diese Steigerung hat seine Ursache darin, daß diejenigen Enzym-DNA-Komplexe, die im rifampicinfreien System in die Elongationsphase übergehen, durch die Anwesenheit des Antibiotikums auf Grund der Blockierung der Bildung von Trinucleosidpentaphosphat zur Synthese von DNTP gezwungen werden.

Somit resultiert die beobachtete Steigerung der pppApU-Synthese durch Rifampicin in Anwesenheit von ATP und UTP als Substrat aus der Erhöhung der Anzahl DNTP synthetisierender Enzym-DNA-Komplexe. Daher können Unterschiede der Syntheseraten in An- und Abwesenheit des Antibiotikums (vgl. Ergebnisse, Kap. II.1,2,3) zum größten Teil durch Enzym-DNA-Komplexe erklärt werden, die

nach der Bindung des Wirkstoffs an Stelle von Oligoribonucleotiden die Synthese von DNTP katalysieren.

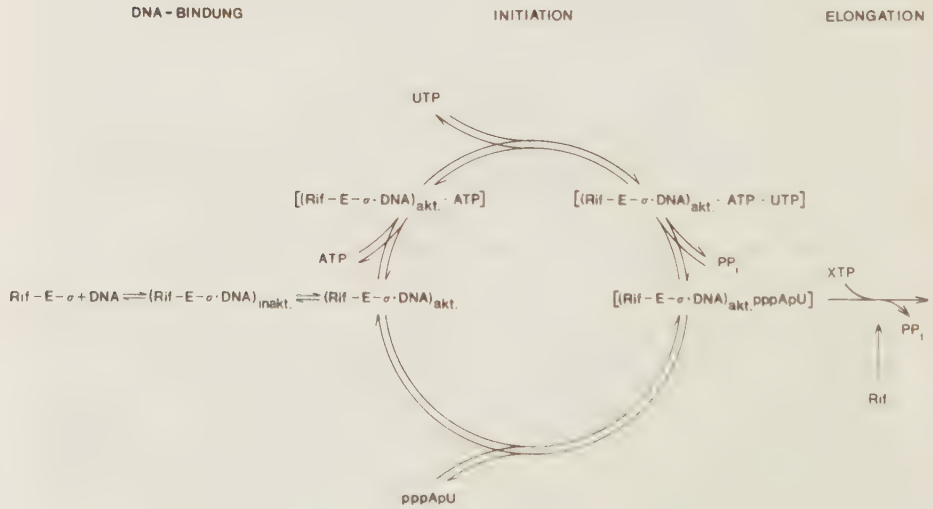
Im Gegensatz dazu wird jedoch die eigentliche Geschwindigkeit der durch E. coli RNA Polymerase katalysierten DNTP-Bildung nur wenig beeinflußt (Fig. 5,6). Diese nur geringe Beeinflussung der DNTP-Bildungsgeschwindigkeit durch Rifampicin ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, daß das Antibiotikum weder die stabile Bindung der RNA Polymerase an die Matrize (Hinkle et al., 1972) noch die Einstellung des Gleichgewichts zwischen den beiden Zustandsformen des Enzym-DNA-Komplexes verhindert (Fig. 23). Vielmehr wird die Stabilität des aktiven Praeinitiationskomplexes durch den Wirkstoff sogar noch etwas gesteigert (McClure und Cech, 1978). Dies ist damit in Übereinstimmung, daß auch das von Saucier und Wang (1972) beobachtete lokale Aufwinden der Matrize bei der Bildung des stabilen Enzym-DNA-Komplexes durch Rifampicin nicht blockiert wird. Auch die Anlagerung der beiden Ribonucleosidtriphosphate während der eigentlichen katalytischen Reaktion wird durch das Antibiotikum nur wenig beeinflußt (Fig. 7,8; McClure und Cech, 1978).
Es ist die Wirkung von Rifampicin auf die Knüpfung der Phosphodiesterbindung und die Ablösung des gebildeten DNTP zwar nicht bekannt, jedoch zeigt der schon erwähnte nur geringe Einfluß des Antibiotikums auf die Gesamtreaktion selbst unter den verschiedensten Reaktionsbedingungen (Fig. 9a, 9b, 11a, 12a), daß das Antibiotikum auch auf diese beiden Teilprozesse der DNTP-Bildung nur einen geringen Einfluß ausüben kann.

Daher ermöglicht die Analyse der DNTP-Synthese in Anwesenheit von Rifampicin das Studium der komplexen Abfolge der DNTP-Bildung unabhängig von dessen Weiterreaktion zu längerkettigen Oligonucleotiden. Somit kann die Katalyse der Bildung von Dinucleosidtetraphosphat durch den Rifampicin-RNA Polymerase Holoenzym-DNA-Komplex als Modell der Initiationsreaktion der Synthese langkettiger Ribonucleinsäure angesehen werden.

Nun bleibt bei der eigentlichen katalytischen Reaktion der DNTP-Bildung nicht nur die Untereinheit Sigma am Enzym gebunden (vgl. Ergebnisse, Kap. III.1), sondern es dissoziiert bei niedriger Ionenstärke auch der gesamte Initiationskomplex selber zu keiner Phase des Reaktionsablaufs (vgl. Ergebnisse, Kap. III.2). Weiterhin konnte die Reihenfolge der Substratanlagerung bei der Katalyse des DNTP-Moleküls eindeutig geklärt werden(Smagowicz und

Scheit, 1977; McClure et al., 1978). Schließlich verdeutlicht die Reaktion des Pyrophosphataustauschs, daß die Katalyse des initiierenden Dinucleotids grundsätzlich reversibel ist (Maitra und Hurvitz, 1967; Krakow und Fronk, 1969). Zwar sind Studien über die Bindung von DNTP an den Rifampicin-Enzym-DNA-Komplex noch nicht durchgeführt worden, jedoch ist anzunehmen, daß auch diese Rückreaktion der Dissoziation des Rifampicin-Enzym-DNA-DNTP-Komplexes grundsätzlich reversibel ist.

Somit kann der Gesamtablauf der Synthese von DNTP und somit der Initiation der Transkription sigmaabhängiger Matrizen durch den Komplex aus Rifampicin und E. coli RNA Polymerase Holoenzym am Beispiel der pppApU-Bildung nahezu vollständig beschrieben werden:



Da die Reihenfolge der Substratanlagerung auch bei der Katalyse der Verknüpfung eines Dinucleosidmonophosphats mit dem folgenden Ribonucleosidtriphosphat mit derjenigen bei der DNTP-Bildung identisch ist (Smagowicz und Scheit,

1978), liegt nahe, daß der beschriebene Reaktionsablauf auch den durch "primer" wie Dinucleosidmonophosphat (Smagowicz und Scheit, 1978; McClure und Cech, 1978; Oen und wu, 1978) oder Trinucleosiddiphosphat (Oen und Wu, 1978) initiierten Beginn der RNA-Synthese beschreibt.

Somit bleibt lediglich die Frage offen, ob das durch die Knüpfung der ersten Phosphodiesterbindung gebildete Produkt vor oder nach dem Vorgang der Translokation vom ternären Komplex abdissiziiert.

Bei dem Prozeß der Translokation wird das RNA-Produkt in den Produktbindungsbereich ("produkt binding site") verschoben (Krakow und Fronk, 1969). Dieser Bindungsbereich ist dadurch gekennzeichnet, daß dort die gebildete RNA gegenüber der hydrolytischen Wirkung von RNasen geschützt ist (Kumar und Krakow, 1975; Rohrer und Zillig, 1977). Dieser Schutz ist dadurch erklärbar, daß sich im Transkriptionskomplex die Konformation sowohl des Enzyms als auch der Matrize ändert. So wird die RNA Polymerase im ternären Elongationskomplex stabiler gegenüber Hitzeinaktivierung (Stead und Jones, 1967) und dem Abbau durch Proteasen (Khesin et al., 1967; Novak und Doty, 1968). Die Konformationsänderung des Enzyms äußert sich aber auch darin, daß im binären Komplex etwa 40 Basenpaare der Matrize (vgl. Gilbert, 1976), im ternären Transkriptionskomplex jedoch nur ein Strang der DNA in einer Länge von nur noch 20 bis 26 Nucleotiden (Novak, 1969; Beabealashvilli et al., 1972; Rohrer und Zillig, 1977) gegen Nucleaseabbau geschützt ist. Auffällig ist, daß diese reduzierte Anzahl der im ternären Komplex geschützten Basen mit der Zahl der Nucleotde übereinstimmt, die bei der Transkription der isolierten DNase-resistenten Promotorfragmenten in kurze Fragmente eingebaut werden kann (vgl. Gilbert, 1976). Dies läßt vermuten, daß das Enzym im Elongationskomplex seine Konformation dahingehend ändert, daß vornehmlich das katalytische Zentrum und der Produktbindungsbereich geschützt ist. Die Tatsache, daß im Transkriptionskomplex nur noch ein Strang der Matrize gegen DNase-Abbau geschützt ist(Rohrer und Zillig, 1977), und daß die RNA-Synthese durch solche Antikörper inhibiert werden kann, die lediglich denaturierte DNA präzipitieren kann (Makarova et al., 1975), sind ebenfalls Hinweise darauf, daß durch die RNA-Bildung auch die Struktur der Matrize geändert wird. Dies zeigt auch das sich wandelnde Spektrum des Zirkulardichroismus bei der Bildung des ternären Komplexes (Beabealashvilli et al., 1972).

Die durch die Bildung von RNA ausgelöste Strukturänderung des gesamten Transkriptionskomplexes hat zur Folge, daß die Komponenten des ternären Komplexes während der in vitro RNA-Synthese selbst bei hoher Ionenstärke (Bremer und Konrad, 1964) nicht dissoziieren (Richardson, 1966a,b). So zeigt sich, daß die Elongationsreaktion bei hoher Ionenstärke sogar stimuliert wird (Fuchs et al., 1967; Rhodes und Chamberlin, 1974). Die erhöhte Stabilität äußert sich auch darin, daß sich der isolierte ternäre Transkriptionskomplex im Gegensatz zum binären Enzym-DNA-Komplex (Jones und Berg, 1966; So und Downey, 1970; Hinkle und Chamberlin, 1972; Giacomoni, 1976) als stabil selbst gegen hohe Salzkonzentrationen erweist (Fukuda und Ishihama, 1971; Naito und Ishihama, 1975).

Die Geschwindigkeit der sequenzspezifischen Bildung von Trinucleosidpentaphosphat, die durch die Verknüpfung der ersten drei Ribonucleosidtriphosphate erfolgt, ist bei 25°C, verglichen mit der Syntheserate der DNTP-Bildung, nur sehr gering (vgl. Ergebnisse, Kap. IV.1a). McClure und Cech (1978) beobachten am λP_R-Promotor nach der Zugabe des dritten Nucleotids auch bei der höheren Temperatur von 37°C eine nur noch relativ geringe Trinucleotidbildung. Die Beobachtungen, daß einerseits für die optimale Katalyse der Elongationsreaktion nur geringe Substratkonzentrationen erforderlich sind (Anthony et al., 1969a; Rhodes und Chamberlin, 1974), andererseits die Elongationsgeschwindigkeit auch in vitro sehr hoch ist (Richardson, 1970; Davis und Hyman, 1970), zeigen, daß die Bindung des elongierenden Ribonucleosidtriphosphats und die darauffolgende Bindungsschließung allein nicht die selbst bei 37°C beobachtete stark unterschiedliche Bildungsrate von Dinucleosidtetraphosphat und Trinucleosidpentaphosphat bewirken kann. Vielmehr liegt es nahe, daß die verschiedene Synthesegeschwindigkeit vornehmlich auf die unterschiedliche Dissoziationsrate des Produkts zurückzuführen ist und somit durch die größere Stabilität des ternären Komplexes nach der Bildung von Trinucleosidpentaphosphat verursacht wird.

Die vorausgehenden Überlegungen sprechen dafür, daß die erhöhte Stabilität des Transkriptionskomplexes in der Bindung des gebildeten Oligonucleotids an den Produktbindungsbereich der RNA Polymerase begründet ist. Da diese stabile Bindung somit erst nach der Translokation des Produkts in diese Region des ternären Komplexes erfolgen kann, ist zu vermuten, daß die unterschiedliche Bildungsrate der Synthese von Dinucleosidtetraphosphat und

Trinucleosidpentaphosphat die Ursache darin hat, daß der Vorgang der Translokation nicht schon durch die Knüpfung der ersten Phosphodiesterbindung während der Phase der Initiation ausgelöst wird, sondern daß das gebildete Oligonucleotid erst nach der Schließung der zweiten Phosphodiesterbindung bei der Elongation des initiierenden Dinucleotids in den Produktbindungsbereich transloziert wird.

Zweifelsfrei kann diese Frage der Translokation des RNA-Produkts letztlich jedoch erst dann beantwortet werden, wenn dieser Bewegungsvorgang experimentell eindeutiger erfaßbar ist.

Zum Mechanismus der Rifampicinwirkung

Das Studium des Reaktionsablaufs der DNTP-Synthese zeigte klar, daß das Antibiotikum an E. coli RNA Polymerase keinen der Teilprozesse der Bildung dieses Moleküls und somit der Bildung des Praeinitiationskomplexes und des anschließenden Ablaufs der Initiationsreaktion wesentlich inhibiert. Dies gilt über die Initiation der RNA-Synthese durch DNTP hinaus generell für den Vorgang der Initiation der Transkription, da auch die durch ein anderes Oligonucleotid (McClure und Cech, 1978; Smagowicz und Scheit, 1978; Oen und Wu, 1978) oder durch reaktive Substratanaloga (Fig. 5b; McClure und Cech, 1978) initiierte RNA Polymerase-Reaktion durch den Wirkstoff nur wenig beeinflußt wird.

Jedoch verhindert der Hemmstoff nahezu vollständig die Bildung langkettiger RNA (Fig. 3; Johnston und McClure, 1976),da die RNA Polymerase schon die Elongation des initiierenden DNTP zum nächst größeren Oligonucleotid, dem Trinucleosidpentaphosphat, nicht mehr katalysieren kann (vgl. Ergebnisse, Kap. I.2; IV.2; Johnston und McClure, 1976; McClure und Cech, 1978). Dies bedeutet aber, daß Rifampicin einen der Initiation folgenden Reaktionsschritte der Elongation von DNTP blockiert.

Nun bewirkt die Zugabe des elongierenden Nucleotids in Form des Monophosphats bei 25°C eine deutliche Reduktion der DNTP-Syntheserate (Fig. 24). Diese Reduktion kann auf Grund der fehlenden Pyrophosphatgruppe nicht auf die Weiterreaktion von Dinucleosidtetraphosphat zu Trinucleosidpentaphosphat zurückgeführt werden, sondern kann nur allein aus der Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen des Basenteils des elongierenden Nucleotids mit

den Komponenten des ternären Komplexes resultieren. Dies ist in Einklang mit der Beobachtung, daß die Reduktion der DNTP-Synthese bei der Erhöung der Temperatur geringer wird (Fig. 27). Dabei verdeutlicht die Spezifität dieser Reaktion, daß das Nucleotidanalogon bei der Anlagerung an den ternären Komplex mit der Matrize in Wechselwirkung tritt, sich also an den katalytischen Bereich der RNA Polymerase anlagert (Tab. 4,5). Weiterhin zeigt die Spezifität der Reaktion, daß die Wirkung des Nucleotids nicht auf die unspezifische Kompetition um die Bindung eines der initiierenden Ribonucleosidtriphosphate und somit auf die Bildung eines "dead end"-Komplexes zurückzuführen ist. Die Spezifität der Anlagerung wird auch durch die Konzentrationsabhängigkeit der Reduktion der DNTP-Bildung unterstrichen, da die nahezu optimale Wirkung schon bei kleinen Konzentrationen im mikromolaren Bereich zu beobachten ist (Fig. 25).

Diese Spezifität legt nahe, daß die Anlagerung des Monophosphats an den Initiationskomplex als Modell für die von der Weiterreaktion unabhängige Anlagerung des elongierenden Nucleotids angesehen werden kann. Dabei muß man aber einschränkend festhalten, daß bei dieser Modellreaktion die ionischen Wechselwirkungen des elongierenden Nucleotids, dessen Bedeutung für den Anlagerungsvorgang nicht abgeschätzt werden kann, nicht eingehen.

Auf Grund der Überlegungen über den Reaktionsablauf der DNTP-Bildung erscheint es plausibel, daß während der Initiationsreaktion das gebildete DNTP nicht in den Produktbindungsbereich transloziert wird. Andererseits ist aber auch nicht zu erwarten, daß die Translokation allein schon durch die zusätzliche Anlagerung des elongierenden Nucleotids ausgelöst wird, da in diesem Fall die freie Energie der Pyrophosphatabspaltung (Jenks et al., 1960; Schuegraf et al., 1960) für den Vorgang der Translokation keine Bedeutung hätte.

Geht man nun von der Vorstellung aus, daß das elongierende Nucleotid durch die spezifische Wechselwirkung mit dem Initiationskomplex auch ohne die vorausgehende oder gleichzeitige Translokation die Bindung des gebildeten DNTP am Enzym-DNA-Komplex stabilisieren kann, so hat dies zur Folge, daß der ternäre Komplex an mehr als zwei Bindungsorten für die spezifische Wechselwirkung mit dem sich anlagernden Nucleotid zugänglich sein muß. Legt man jedoch das von Krakow und Fronk (1969) und Krakow und von der Helm (1970) vorgeschlagene Modell der Katalyse der RNA-Synthese zugrunde, so ist die Anla-

gerung des elongierenden Nucleotids erst während oder nach der Translokation des bereits gebildeten RNA-Produkts möglich. Die Autoren gehen nämlich auf Grund der Analyse des Pyrophosphataustauschs von der Vorstellung aus, daß der binäre RNA Polymerase-DNA-Komplex lediglich zwei Bindungsstellen für die Substratanlagerung besitzt. Dabei postulieren die Autoren, daß das die Initiation einleitende Purin-Ribonucleotid an die "initiation site" bindet, während sich die nachfolgenden Nucleotide nur an den anderen Bindungsort, die "substrat site", anlagern können. Dieses Modell beinhaltet weiterhin, daß die "initiation site" ebenfalls als Bindungsort des translozierten RNA-Produkts, also als "product terminus site", fungiert.

Diese allgemein als Grundlage für kinetische Untersuchungen der RNA Polymerase-Reaktion akzeptierte Modellvorstellung (vgl. Chamberlin, 1976), die beinhaltet, daß der Enzym-DNA-Komplex lediglich zwei Substratbindungsstellen besitzt, stützt sich jedoch weitgehend auf Untersuchungen über die Substratanlagerung an die freie RNA Polymerase in Abwesenheit von DNA (Wu und Goldthwait, 1969a, 1969b). Auch beweist die Reaktion des Pyrophosphataustauschs die Existenz maximal zweier Substratbindungsstellen nicht schlüssig, da bei dieser Reaktion lediglich der Reaktionsablauf der Verknüpfung der beiden initiierenden , jedoch nicht der weiteren elongierenden Nucleotide umgekehrt wird. Ebenso lassen die kinetischen Untersuchungen über die Elongationsreaktion von Rhodes und Chamberlin (1974) und Solage und Cedar (1976) keine exakten Rückschlüsse auf die Zahl der Substratbindungsstellen tz, sondern sind lediglich damit in Einklang, daß der ternäre Transkriptionskomplex während der Elongation zwischen zwei Zuständen unterschiedlicher Konformation oszilliert.

Es gibt Hinweise darauf, daß die RNA Polymerase im ternären Komplex mehr als eine Bindungsstelle für die spezifische Wechselwirkung des elongierenden Nucleotids mit dem katalytischen Bereich des Enzym-DNA-Komplexes besitzt. So vermuten Slepneva et al.(1978) auf Grund der unterschiedlichen Wirkung von Substratanaloga auf die poly r(A-U)-Synthese und den Pyrophosphataustausch, daß die RNA Polymerase im im Komplex mit der DNA multiple Bindungsstellen für Substrate aufweist. In der gleichen Weise läßt sich auch die von Spoor et al. (1970) bei mikromolaren Konzentrationen beobachtete nichtkompetitive Hemmung der RNA-Bildung durch Purinderivate deuten. Weiterhin ist die den Michaelis-Konstanten entgegengesetzte Reihenfolge

der Substratanlagerung bei der DNTP-Synthese (Smagowitz und Scheit, 1977; McClure et al., 1978) ein Hinweis darauf, daß durch die Anlagerung des vorhergehenden Substrats das folgende Basenpaar der Matrize für eine direkte Wechselwirkung der Basen zugänglich gemacht wird. Schließlich weisen auch Experimente von Smagowicz und Scheit (1978) am Promotor A_3 des Phagen T7 stark darauf hin, daß die Matrize nach der Bildung des initiierenden Dinucleotids für die direkte Basenwechselwirkung auch ohne den vorausgehenden Ablauf der Translokation erreichbar ist. So kann sich nach der Bindung des der Anfangssequenz des Transkripts entsprechenden Dinucleotids ApU (vgl. Pribnow, 1975) als initiierendes Dinucleotid, bei der wegen der fehlenden freien Energie der Bindungsschließung keine Translokation dieses initiierenden Dinucleotids stattgefunden haben kann, das entsprechend der Basensequenz folgende reagierende Nucleotid GTP mit nur geringfügig langsamerer Geschwindigkeit anlagern als unter gleichen Bedingungen UTP bei der Initiation durch die Bilung von pppApU.

Es ist somit durchaus vorstellbar, daß das elongierende Nucleotid auch ohne den vorausgehenden oder gleichzeitigen Ablauf des Translokationsvorgangs sowohl durch die spezifische Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit der Matrize als auch durch hydrophobe und ionische Wechselwirkung mit dem schon gebildeten DNTP und der Bindungsregion des Enzyms den Initiationskomplex entscheidend stabilisieren kann.

Die identische Reduktion der pppApU-Synthese an T7 D111 DNA als Matrize durch CMP in An- und Abwesenheit von Rifampicin zeigt klar, daß das Antibiotikum die allein aus der Anlagerung des elongierenden Nucleotids resultierende Stabilisierung des Initiationskomplexes nicht beeinträchtigt (Fig. 24, 25). Dies wird dadurch bestätigt, daß in Gegenwart von Rifampicin bei der Zugabe des auf Grund der Triphosphatgruppe zum vollständigen Ablauf der spezifischen Elongationsreaktion befähigten Ribonucleosidtriphosphat CTP lediglich das bei der Anlagerung des entsprechenden Monophosphats CMP beobachtete Ausmaß der Reduktion der DNTP-Synthese zur Folge hat (Fig. 25). Diese Wirkung von Rifampicin steht nicht im Widerspruch zu den Befunden von McClure und Cech (1978), da diese Autoren den Einfluß des Antibiotikums auf die Reduktion der DNTP-Bildung durch das elongierende Nucleotid bei 37°C studierten, wo dessen stabilisierende Wirkung nur geringfügig zum Tragen kommt (vgl. Fig. 27).

Diese Inhibierung der nur in Anwesenheit des Ribonucleosidtriphosphats beobachteten zusätzlichen Stabilisierung des Initiationskomplexes durch Rifampicin, die auf Grund der vollen Reaktionsfähigkeit des elongierenden CTP nur durch die Weiterreaktion des Dinucleosidtetraphosphats zum entsprechenden Trinucleosidpentaphosphat verursacht worden sein kann (vgl. Fig. 24,25), begründet nun die Vorstellung, daß zwar die Anlagerung des elongierenden Nucleotids durch das Antibiotikum nicht beeinflußt wird, dessen Weiterreaktion zu Trinucleosidpentaphosphat jedoch nach der Bindung des Hemmstoffs an die RNA Polymerase nicht mehr möglich ist (vgl. Ergebnisse, Kap. I.2; IV.1a; Johnston und McClure, 1976; McClure und Cech, 1978).

Da somit die Anlagerung sowohl der initiierenden Ribonucleosidtriphosphate (Fig. 7a,b; 8a,b; McClure und Cech, 1978) als auch des elongierenden Nucleotids, also die Substratanlagerung grundsätzlich durch Rifampicin nicht blokkiert wird, muß man schließen, daß das Antibiotikum einen Reaktionsschritt der Elongation des initiierenden DNTP nach der Anlagerung des elongierenden Nucleotids verhindert.

Nun fanden kürzlich McClure und Cech(1978), daß E. coli RNA Polymerase am λP_R-Promotor von λb2 DNA bei der Inkubation mit ADP oder AMP an Stelle von ATP als das die Initiation einleitende Nucleotid auch nach der Bindung von Rifampicin an das Enzym nicht nur die Kondensation zweier Nucleotide zum entsprechenden Dinucleotid, sondern weitergehend durch die Knüpfung der zweiten Phosphodiesterbindung auch noch die Bildung von Trinucleotiden katalysieren kann. Diese Beobachtung bestätigt einerseits die Vorstellung, daß trotz der Anwesenheit des Antibiotikums auch die Anlagerung des elongierenden Substrats grundsätzlich noch möglich ist, weist aber andererseits stark darauf hin, daß der Hemmstoff über die Substratanlagerung hinaus auch die Fähigkeit der E. coli RNA Polymerase zur Bindungsschließung prinzipiell nicht blockiert.

Während des Vorgangs der Elongation wird durch die Knüpfung der Phosphodiesterbindung und Translokation die wachsende RNA-Kette in den schon im vorausgehenden Abschnitt charakterisierten Produktbindungsbereich verschoben. Es ist aus energetischen Gründen sehr wahrscheinlich, daß nicht nur die von Krakow und Fronk (1969), Spoor et al. (1970) und Krakow und von der Helm (1970) beschriebene, mit der "initiation site" identische "product terminus site", sondern der gesante Produktbindungsbereich, die "product site",

für die Bindung des translozierten RNA-Moleküls entscheidend ist (vgl. auch Kumar und Krakow, 1975). Dies wird schon dadurch unterstützt, daß die "initiation site" durch eine im Vergleich zur überaus festen Bindung des wachsenden Transkripts an den Enzym-DNA-Komplex (Bremer und Konrad, 1964; Richardson, 1966; Fukuda und Ishihama, 1971; Naito und Ishihama, 1975) wesentlich geringere Affinität für das die Initiation einleitende Purin-Ribonucleosidtriphosphat ausgezeichnet ist (Anthony et al., 1969a; Smagowitz und Scheit, 1977; McClure und Cech, 1978).

Die Ergebnisse der Analyse der Wirkung von Rifampicin auf die in vitro Synthese langkettiger RNA (vgl. Ergebnisse, Kap. V.A) weisen darauf hin, daß das Antibiotikum die Bindung des RNA-Produkts an diesen Produktbindungsbereich inhibiert. Dabei zeigt die Analyse der Wirkung von Rifampicin auf das Ausmaß der in vitro RNA-Bildung, daß der Hemmstoff um so weniger an die RNA Polymerase binden kann, je weiter die RNA-Synthese fortgeschritten ist (vgl. V.A.1,2). Dies verdeutlicht die unterschiedliche Stabilität der isolierten Enzym-DNA- bzw. Enzym-DNA-RNA-Komplexe gegenüber der Wirkung des Antibiotikums (Fig. 33, 32). So ist das Enzym erst im Elongationskomplex (Fig. 31, 32), nicht aber schon durch die Bildung des stabilen Praeinitiationskomplexes oder des Initiationskomplexes während der DNTP-Bildung (Fig. 33) dauerhaft vor der spezifischen Bindung des Wirkstoffs geschützt.

Untersuchungen von So und Downey (1970), Terao et al. (1972), Minkley und Pribnow (1973), Dausse et al. (1975), Axelrod (1976) und Yarbrough et al. (1976) lassen vermuten, daß schon die Bildung eines kurzen Oligoribonucleotids diesen Schutz gegenüber der Bindung von Rifampicin hervorrufen kann. Dies wird auch durch die Beobachtung von Stender et al. (1975) nahegelegt, da die RNA Polymerase durch die Anlagerung eines kurzen RNA-DNA-Hybrids vor der kovalenten Bindung eines reaktiven Rifamycin-Derivats geschützt werden kann. Dabei zeigt die verglichen mit der Stabilität während der laufenden Elongation ebenfalls große Stabilität des Transkriptionskomplexes auch in Abwesenheit von Substrat (vgl. Fig. 31 und 32), daß die stark verminderte Anlagerungsgeschwindigkeit des Antibiotikums an den ternären Komplex nicht an die ablaufende Katalyse der Elongationsreaktion gebunden ist.

Die Tatsache, daß die Rifampicin-Bindung nicht nur im ternären Transkriptionskomplex, sondern auch schon in Abwesenheit von DNA durch die Inkubation der freien RNA Polymerase mit exogener RNA ähnlich stark reduziert

ist (vgl. Fig. 32 und 39; auch Lill und Hartmann, 1973), verdeutlicht, daß das Antibiotikum um die RNA-Bindungsstelle kompetiert.

Diese Zurückführung der Rifampicinwirkung allein auf die Kompetition um die Bindung von RNA an RNA Polymerase wird durch die Beobachtung unterstrichen, daß auch umgekehrt das Antibiotikum die Anlagerung exogener RNA an das freie Enzym beträchtlich vermindert (Fig. 37a,b). Dieser Schutz des Enzyms durch Rifampicin vor der Bindung exogener RNA ist spezifisch, da er schon von kleinen Konzentrationen des Wirkstoffs hervorgerufen wird (Tab. 6) und in der dauerhaften Weise gegenüber anderen Polyanionen wie Heparin (Tab. 6) oder DNA (Fig. 33) nicht zu beobachten ist. Dabei ist die Temperaturabhängigkeit der Wirkung des Antibiotikums (Tab. 8) ein Hinweis darauf, daß der beobachtete Schutzeffekt wesentlich von der Stabilität des Rifampicin-Enzym-Komplexes beeinflußt wird. Jedoch bleibt festzuhalten, daß die zusätzliche Bindung der Matrize an die RNA Polymerase den abschirmenden Effekt von Rifampicin verstärkt (Fig. 37a,b).

Die Beobachtung, daß allein schon die Anlagerung von exogener RNA an die freie RNA Polymerase das Enzym in ähnlicher Weise wie im ternären Transkriptionskomplex gegenüber der Bindung von Rifampicin abschirmt, läßt vermuten, daß umgekehrt der deutliche Schutz der RNA Polymerase durch das Antibiotikum gegenüber der Bindung von exogener RNA ein Modell für die Wirkung des Hemmstoffs auf die *in vitro* Synthese von Ribonucleinsäure beschreibt.

Dies stützt die Hypothese, daß die Elongation des initiierenden Dinucleosidtetraphosphat zu Trinucleosidpentaphosphat und darüber hinaus zu langen RNA-Ketten durch Rifampicin dadurch inhibiert wird, daß das Antibiotikum die Bindung des RNA-Produkts an den Produktbindungsbereich des RNA Polymerase-DNA-Komplexes verhindert.

Diese Deutung der Rifampicinwirkung ist in Einklang mit den Befunden von McClure und Cech (1978), geht jedoch über das auf rein räumlichen Parametern basierende Modell dieser Autoren hinaus, da von der Anlagerung der gebildeten RNA an den Produktbindungsbereich des Enzym-DNA-Komplexes anzunehmen ist, daß sie nicht nur durch sterische, sondern gleichermaßen auch durch ionische oder hydrophobe Wechselwirkung stark beeinflußt wird. Die Vorstellung, daß die Raumerfüllung des Produkts nicht der einzig steuernde Parameter sein kann, belegt schon die Beobachtung von McClure und Cech

(1978), daß Rifampicin am λP_R-Promotor von λb2 DNA zwar die Synthese von pppApUpG verhindert, die Bildung von ppApUpG jedoch weniger inhibiert wird als das räumlich kleinere Trinucleotid pApUpG. Vielmehr ist anzunehmen, daß die inhibitorische Wirkung des Antibiotikums zusätzlich zumindest auch von der Ladungsdichte am 5'-Ende des schon gebildeten Oligonucleotids abhängig ist. Eine weitere Bestätigung dieser Vorstellung könnte durch Untersuchungen über die Produktbildung in Anwesenheit von Rifampicin mit Hilfe solcher Nucleotidanaloga erbracht werden, welche die Initiation der RNA Polymerase-Reaktion noch einleiten können, sich jedoch in Ladung und Struktur stark unterscheiden.

Nun ist es ein experimenteller Befund, daß bei der Initiation der RNA-Synthese schon die vor der Bindung des elongierten Dinucleosidtetraphosphats an den Produktbindungsbereich notwendige Knüpfung der zweiten Phosphodiesterbindung durch den Rifampicin-Enzym-DNA-Komplex nicht mehr katalysiert wird (vgl. Ergebnisse, Kap. I.2; IV.2; Johnston und McClure, 1976; McClure und Cech, 1978). Dies ist bei dem vorgeschlagenen Mechanismus der Rifampicinwirkung nur dann verständlich, wenn zumindest die drei beim Prozeß der Elongation aufeinanderfolgenden Teilprozesse der Bindungsknüpfung, Translokation und Produktanlagerung synchron ablaufen und somit aneinander gekoppelt sind. Dies liegt jedoch schon aus energetischen Gründen nahe, da man davon ausgehen muß, daß nicht nur die Pyrophosphatabspaltung, sondern auch die Anlagerung des Produkts an den Produktbindungsbereich energieliefernde Vorgänge sind. Da bei der Elongationsreaktion während der Bildung langkettiger Ribonucleinsäure im Gegensatz zu der analogen Reaktion während der ribosomalen Proteinsynthese, bei der die freie Energie der eigentlichen katalytischen Reaktion um die durch zusätzliche Faktoren vermittelte freie Energie der Hydrolyse von GTP erhöht wird (vgl. Haselkorn und Rothman-Denes, 1973), keine zusätzliche Energielieferung bekannt ist, erscheint eine Kopplung der Bindungsknüpfung, des Translokationsvorgangs und der Produktanlagerung durchaus sinnvoll. Somit ist es vorstellbar, daß die Blockierung des abschließenden Reaktionsschritts der Elongation des initiierenden DNTP die Verhinderung davorliegender, synchron ablaufender Teilprozesse zur Folge haben kann.

Dies würde aber bedeuten, daß Rifampicin die Elongation des initiierenden Dinucleosidtetraphosphats zu Trinucleosidpentaphoaphat dadurch inhibiert,

daß das Antibiotikum durch die Blockierung der Produktbindung schon die vorausgehenden , an diese Anlagerungsreaktion gekoppelten synchronen Prozesse der zweiten Bindungsschließung und Translokation verhindert.

Dabei muß man aber festhalten, daß die Wirkung von Rifampicin unter der Voraussetzung erörtert wurde, daß der Vorgang der Translokation allein durch die Bildung von Dinucleosidtetraphosphat während der Initiationsphase noch nicht ausgelöst wird. Nun zeigen aber die Experimente von McClure und Cech (1978), daß Rifampicin die Weiterreaktion des initiierenden Dinucleotids, also auch die Translokation des durch die Knüpfung der zweiten Phosphodiesterbindung gebildeten Oligonucleotids in den Produktbindungsbereich, prinzipiell nicht verhindert, da bei einer speziellen Modifizierung des initiierenden Dinucleotids die Elongation zum entsprechenden Trinucleotid noch möglich ist. Daher ist es auch nicht definitiv auszuschließen, daß nicht doch schon während der Phase der Initiation, also der DNTP-Bildung, die Translokation des synthetisierten Dinucleotids in den Produktbindungsbereich stattfindet.

In diesem Fall könnte die beobachtete Wirkung des dritten Nucleotis auf die DNTP-Bildung (vgl. Ergebnisse, Kap. IV) mit Hilfe der einfacheren Modellvorstellung von Krakow und Fronk (1969) und Krakow und von der Helm (1970) über die Katalyse von RNA erklärt werden, da unter diesen Umständen die Bindung des initiierenden DNTP an den Enzym-DNA-Komplex durch die Anlagerung des elongierenden Nucleotids an die durch den Translokationsvorgang freigewordene "substrate site" stabilisiert werden kann.

Andererseits würde diese Vorstellung aber verlangen, daß Rifampicin verschiedene Regionen des Produktbindungsbereichs in unterschiedlicher Weise beeinflußt. Da nämlich das Antibiotikum die DNTP-Bildungsrate nur wenig verändert, sollte bei der Translokation des RNA-Produkts schon während der Bildung von DNTP die Bindung des Dinucleotids an den Produktbindungsbereich nur unwesentlich beeinflußt werden. Im Gegensatz dazu wäre jedoch zu fordern, daß die Bildung des nächst größeren Oligonucleotids, des Trinucleosidpentaphosphats, nach dem folgenden Translokationsvorgang vollständig verhindert wird. Eine solch abgestufte, differenzierte Wirkung kann jedoch auf Grund des generellen Charakters der beobachteten Wechselwirkung zwischen dem Antibiotikum und der Ribonucleinsäure um die Bindung an freie RNA Polymerase oder den RNA Polymerase-DNA-Komplex (vgl. Ergebnisse, Kap. V.A,B)

nicht postuliert werden, was jedoch nicht damit gleichzusetzen ist, daß eine solch differenzierte Wirkungsweise des Hemmstoffs nicht vorstellbar wäre.

Zur Topologie der Rifampicinbindung

Es bleibt die interessante Frage offen, ob sich Rifampicin direkt an die Produktbindungsstelle anlagert, oder ob diese durch das Antibiotikum in allosterischer Weise indirekt beeinflußt wird. Zwar kann diese Frage erst definitiv beantwortet werden, wenn eine Röntgenstrukturanalyse des Rifampicin-RNA Polymerase-Komplexes möglich ist, doch gibt es auch einige indirekte Hinweise darauf, daß die Anlagerung des Antibiotikums direkt an die Produktbindungsstelle des Enzyms erfolgt.

Zwar weisen die von Stender und Scheit (1976) durch Chromatographie an Phosphocellulose und die von Bähr et al. (1976) durch Fluoreszenztitration beobachteten biphasigen Anlagerungs- und Dissoziationsreaktionen, und die von Yarbrough et al. (1976) ebenfalls durch Fluoreszenstitration bestimmte nichtlineare Konzentrationsabhängigkeit der Rifampicinbindung an RNA Polymerase auf eine allostarische Wirkung des Antibiotikums hin. Jedoch vermutet Wehrli (1877b), daß der jeweils beobachtete biphasige Kurvenverlauf auf die Heterogenität der durch RNA-Fragmente verunreinigten Enzym-Präparation zurückzuführen ist. So konnte Wehrli (1977b) durch die direkte Bestimmung der Bindung von Rifampicin an RNA Polymerase zeigen, daß bei hochgereinigten, ribonucleinsäurefreien Enzym-Präparationen lineare Assoziations- und Dissoziationskinetiken zu beobachten sind. Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis darauf, daß sich das Antibiotikum direkt an die Produktbindungsstelle anlagert. Dies ist auch in Einklang damit, daß die gegenseitige Beeinflussung allein von exogener RNA und Rifampicin um die Bindung an freie RNA Polymerase schon in Abwesenheit aller Reaktionskomponenten zu beobachten ist (vgl. Ergebnisse, Kap. V.B).

Nun gibt es auch Hinweise ganz anderer Art, daß Rifampicin direkt an das katalytische Zentrum der RNA Polymerase bindet. Heil und Zillig (1970) konnten durch den Vergleich der Rifampicinsensitivität verschiedener Enzymchimären, die durch den selektiven Austausch rifampicinsensitiver gegen resistente Untereinheiten der RNA Polymerase erhalten wurden, zeigen, daß

das Antibiotikum im intakten Enzym an die Untereinheit β bindet. Dies ist in Einklang mit der spezifischen Markierung vorwiegend der β-Untereinheit bei der kovalenten Verknüpfung des RNA Polymerase Coreenzyms mit einem reaktiven, radioaktiv markierten Rifamycin-Derivat (Stender et al., 1975). Jedoch bindet Rifampicin spezifisch nicht an die isolierte Untereinheit β, sondern nur an das unvollständige Enzymhybrid $\alpha_2\beta$, Core- oder Holoenzym (Lill und Hartmann, 1973; Stetter und Zillig, 1974; Hartmann, 1976a; Lowe und Malcolm, 1976; Lill und Hartmann, 1977; Heumann, 1978). Daraus muß man schließen, daß die Anlagerung des Antibiotikums stark von der Konformation der Bindungsstelle abhängig ist. Dies ist jedoch verständlich, da alle bisherigen Beobachtungen darauf hinweisen, daß der Wirkstoff keine kovalente Bindung mit der RNA Polymerase eingeht [28].

Nun binden alle bisher näher untersuchten RNA Polymerasen aus der prokariotischen Gruppe der Eubakterien das Antibiotikum Rifampicin [29]. Demgegenüber scheinen RNA Polymerasen aus der prokariotischen Gruppe der Archebak-

---

28) So ist die Anlagerung des Antibiotikums an die RNA Polymerase empfindlich gegenüber wiederholtem Einfrieren und Auftauen in 1 mol/l LiCl oder der Behandlung mit Guanidiniumchlorid (Lill und Hartmann, 1973). Auch wird bei der Dissoziation des Rifampicin-Enzym-Komplexes bezüglich der RNA-Synthese aktive RNA Polymerase zurückerhalten, die zur erneuten Bindung des Antibiotikums befähigt ist (Wehrli et al., 1976). Ebenso spricht die abnehmende Stabilität des Rifampicin-Enzym-Komplexes, die bei verschiedenen RNA Polymerasen mit steigender Resistenz gegenüber Rifampicin oder mit mehreren weniger aktiven Rifamycin-Derivaten beobachtet wurde, gegen die Existenz einer kovalenten Bindung (Wehrli und Stähli, 1971). Vielmehr zeigt der destabilisierende Einfluß von Dimethylsulfoxid auf die Rifampicin-Anlagerung, daß die Ausbilung hydrophober Wechselwirkungen für die Bindung des Wirkstoffs an das Enzym entscheidend ist (Wehrli, 1977b). Weiterhin zeigen Bindungsstudien und Struktur-Aktivitätsbeziehungen mit unterschiedlichen natürlichen und semisynthetischen Rifamycin-Derivaten, daß auch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken durch freie Hydroxylgruppen sowohl des unversehrten Ansarings als auch des Naphtochinon-Chromophors die Bindung des Antibiotikums stabilisieren (Wehrli und Staehlin, 1969; Brufani et al., 1974). Da die Bindung von Rifampicin an RNA Polymerase eine charakteristische bathochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums bewirkt, ist der Chromophor möglicherweise ebenfalls an der Stabilisierung dse Rifampicin-Enzym-Komplexes beteiligt (vgl Wehrli, 1977a).

29) Es werden nicht nur RNA Polymerasen aus verschiedenen Klassen gram-ne-

terien wie Halobacterium halobium und Sulfolobus acidocaldarius resistent gegenüber der Wirkung des Antibiotikums zu sein (Zillig et al., 1979). Jedoch ist die Zusammensetzung der Untereinheiten dieser RNA Polymerasen verschieden von derjenigen typischer eubakterieller RNA Polymerasen (Zillig et al.,1978; Zillig et al., 1979).

Immunologische Untersuchungen von Leib (1979) verdeutlichen aber, daß RNA Polymerasen aus taxonomisch weit entfernten Klassen von Eubakterien stark unterschiedliche Oberflächengestalt besitzen. Dies äußert sich einerseits darin, daß man bei der Immundiffusion keine Kreuzreaktion des Micrococcus luteus Core- und Holoenzyms mit dem Antiserum gegen das Holoenzym der RNA Polymerase aus Escherichia coli und umgekehrt nur eine schwache Kreuzreaktion des Escherichia coli Core- oder Holoenzyms mit dem Antiserum gegen das Holoenzym der RNA Polymerase aus Micrococcus luteus beobachtet. Andererseits kommt dies auch durch die bei der Komplementfixierung bestimmten großen immunologischen Distanzen von RNA Polymerase Holoenzym aus verschiedenen Klassen von Eubakterien zum Ausdruck. Jedoch zeigen der immunologische Vergleich der intakten Enzyme aus Escherichia coli und Micrococcus luteus mit den jeweils homologen isolierten Untereinheiten, und die partielle Inhibierung des aktiven Zentrums der RNA Polymerase aus Micrococcus luteus durch das bei der Immundiffusion inaktive Antiserum gegen Escherichia coli RNA Polymerase, daß die räumlichen Strukturen an den Kontaktflächen der Untereinheiten sowie im Bereich der aktiven Zentren weitaus ähnlicher als die Oberflächen der verschiedenen untersuchten RNA Polymerasen sind. Darüber hinaus läßt dieses Ergebnis vermuten, daß der katalytische Bereich der RNA Polymerase in der Nähe der Kontaktflächen der Untereinheiten lokalisiert ist.

Diese im Verlauf der Evolution unterschiedliche Konservierung verschiedener

---

gativer Eubakterien wie Escherichia coli (Hartmann et al., 1967), Azotobacter vinelandii (Bmakow und von der Helm, 1970) oder Pseudomonas BAL-31 (Zimmer und Millette, 1975), sondern auch gram-positiver Eubakterien wie Lactobacillus curvatus (Stetter und Zillig, 1974), Bacillus subtilis (Avila et al., 1971) und Micrococcus luteus (Lill et al., 1975) durch das Antibiotikum inaktiviert. Auch bindet Rifampicin an RNA Polymerasen spezieller Gruppen der Eubakterien wie Caulobacter crescentus (Amamiya et al., 1977), Agrobacterium tumefaciens (Knepf, 1975) oder die blau-grüne Alge Anacystis nidulans (Herzfeld und Rath, 1971).

Bereiche der RNA Polymerase äußert sich auch darin, daß die eigentliche katalytische Reaktion bei allen RNA Polymerasen identisch ist, die Spezifität der Transkriptionsreaktion, die wahrscheinlich durch die gesamte räumliche Struktur des Enzyms bestimmt wird (vgl. Mailhammer et al., 1975), jedoch bei Enzymen aus taxonomisch verschiedenen Klassen von Eubakterien unterschiedlich ist (Leib et al., in Vorbereitung; Wiggs et al., 1979; Iida et al., 1979; Zimmer und Millette, 1979).

Die Beobachtung, daß RNA Polymerasen aus taxonomisch weit entfernten Klassen von Eubakterien jedoch trotz der großen Unterschiede in der Struktur der Enzymoberfläche sensitiv gegenüber der Wirkung von Rifampicin sind, andererseits die Bindung des Antibiotikums stark von der Konformation der Bindungsstelle anhängig ist, legt nahe, daß sich der Wirkstoff an den weitaus besser konservierten katalytischen Bereich und somit direkt an den Produktbindungsbereich anlagert.

Diese Anschauung ist damit in Einklang, daß sowohl die katalytische Aktivität der RNA Polymerase als auch die Empfinlichkeit gegenüber Rifampicin bei der Bildung von Enzymchimären nicht nur aus taxonomisch relativ nahe verwandten Klassen von Eubakterien wie Escherichia coli und Serratia marcescens (Konze-Thomas und Rüger, 1976), sondern auch aus taxonomisch sehr entfernten Bakterienklassen wie Escherichia coli und Micrococcus luteus (Lill et al., 1975; Hartmann, 1976b) nicht verloren geht.

Auch die bleibende Rifampicin-Sensitivität der Escherichia coli RNA Polymerase bei der Infektion von Escherichia coli durch den Phagen T4 (Geiduschek und Sklar, 1969; Haselkorn, 1969) unterstützt die Vorstellung, daß das Antibiotikum direkt an den katalytischen Bereich des Enzyms bindet. Es ist bei dem Vorgang der T4 Infektion bekannt, daß die Escherichia coli RNA Polymerase stark modifiziert wird (vgl. Zillig et al., 1976; Losick und Pero, 1976). So beobachtet man kurz nach dem Beginn der Infektion nicht nur eine Alteration der Wirtspolymerase durch ADP-Ribosylierung einer der beiden α-Untereinheiten durch NAD^+-Protein-ADP-Ribosyltransferase (Rohrer et al., 1975), sondern ebenfalls die Modifikation des Enzyms durch die ADP-Ribosylierung beider α-Untereinheiten mit Hilfe eines durch die DNA des Phagen codierten Proteins (Goff, 1974). Darüber hinaus zeigt die Analyse des tryptischen Abbaus der RNA Polymerase, daß nach der T4 Infektion zumindest auch die β-Untereinheit zusätzlich strukturell signifikant modifi-

ziert wird (Schachner und Zillig, 1971). Auch wird die Bindungsaffinität des σ-Faktors stark reduziert (Travers, 1970). Zusätzlich zu den Veränderungen der Enzymstruktur lagern sich in der späten Phase der Infektion mehrere T4-codierte Polypeptide an die Oberfläche der Wirtspolymerase an (Stevens, 1972; Horvitz, 1973; Ratner, 1974a,b; vgl. auch Losick und Pero, 1976).

Nun konnten Dunn et al. (1971) zeigen, daß trotz all dieser Veränderungen der Oberfläche und Struktur der Escherichia coli RNA Polymerase im Gegensatz zu der Infektion durch den Phagen T3 und T7, wo schon kurz nach Infektionsbeginn die Wirtspolymerase inaktiviert wird (vgl. Losick und Pero, 1976) und die weitere Transkription der infizierenden Phagen-DNA durch phagencodierte RNA Polymerasen katalysiert wird (Maitra,1971; Chamberlin et al., 1970), bei der Infektion durch den Phagen T4 die Fähigkeit zur katalytischen Reaktion während des gesamten Infektionsverlaufs erhalten bleibt. Dagegen wird die Spezifität der Transkription stark verändert (Mailhammer et al., 1975). Daraus muß man wiederum schließen, daß der Bereich des katalytischen Zentrums der E. coli RNA Polymerase während der gesamten T4-Infektion nur wenig modifiziert wird, obwohl die Struktur des Enzyms in mehrfacher Hinsicht stark verändert wird. Die Tatsache, daß bei diesem Vorgang die Sensitivität des Enzyms gegenüber Rifampicin ebenfalls erhalten bleibt, ist ein weiteres Argument dafür, daß das Antibiotikum direkt am katalytischen Bereich angreift.

All die genannten Überlegungen deuten somit darauf hin, daß die Anlagerung von Rifampicin an die Untereinheit β der E. coli RNA Polymerase direkt am Produktbindungsbereich, der daher ebenso zumindest teilweise an der β-Untereinheit lokalisiert sein muß, stattfindet.

Studien über die Bindung verschiedendster Substratanaloga an die E. coli RNA Polymerase legen nahe, daß auch die Substratbindung an der Untereinheit β stattfindet (Spoor et al., 1970; Nixon et al., 1972; Frischauf und Scheit, 1073; Armstromg et al., 1976).

Im Gegensatz dazu sprechen viele Argumente dafür, daß sich die Matrize an die andere große Untereinheit β' anlagert. So wird die an β' lokalisierte tsX-Mutation in den E. coli-Stämmen T16 und Ts19 (Panny et al., 1974), die die Thermosensitivität der RNA Polymerase auch in vitro zur Folge hat (Khesin et al., 1969), hauptsächlich dadurch hervorgerufen, daß die Bindung des Enzyms an die Matrize stark reduziert ist (Khesin et al., 1969; Panny et al.,

1974). Auch verändert die in den E. coli Stämmen XH 56 (Claeys et al., 1976) von Gross et al. (1976) beobachtet Mutation der RNA Polymerase in der Untereinheit β' das Enzym in der Weise, daß die Bindung der RNA Polymerase an Promotorregionen nicht mehr möglich ist. Ein weiteres Argument für die Lokalisation des DNA-Bindungsbereichs an β' ist, daß das zur DNA analoge Polyanion Heparin an β' bindet und direkt um die Anlagerung von markierter T4 DNA kompetiert (Zillig et al., 1970). Auch weist von den isolierten Untereinheiten das Polypeptid β' die größte Kapazität für die Bindung von DNA auf (Sehti und Zillig, 1970; Fukuda und Ishihama, 1974; Yarbrough und Hurwitz, 1974). So ist auch verständlich, daß vornehmlich die β'-Untereinheit mit reaktiven DNA-Derivaten kovalent verknüpft wird (Frischauf und Scheit, 1973; Okada et al., 1978).

Jedoch zeigen die photochemischen Studien von Hillel und Wu (1978) mit markierter T7 DNA, daß die Matrize bei der Bestrahlung des Enzym-DNA-Komplexes nicht nur an die Untereinheit β', sondern auch an die andere große Untereinheit β bindet. Dabei wird die Wechselwirkung der DNA mit der Untereinheit β durch den Beginn der RNA-Synthese sogar noch verstärkt.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß die Bindung der DNA nahe der Kontaktstelle der beiden großen Untereinheiten lokalisiert sein muß. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, daß durch die Bindung von poly d(A-T) an die RNA Polymerase sowohl β als auch β' gegen die Markierung von ε-Aminogruppen von Lysinresten durch Fluorescamin geschützt sind (S. Damjanowich, zitiert in Jovin und Scheit, 1975).

Nun wurde auf der Basis verschiedener Methoden wie der chemischen Modifizierung der RNA Polymerase durch bifunktionelle Reagentien (King et al., 1974; Hillel und Wu, 1977), dem Abbau durch Proteasen (Lill und Hartmann, 1975) und der kovalenten Bindung von reaktiven DNA-Derivaten (Okada et al., 1978) ein topographisches Modell der RNA Polymerase vorgeschlagen, in dem die beiden großen Untereinheiten in engem Kontakt stehen und durch den nicht von den beiden α-Untereinheiten und dem σ-Faktor abgeschirmten Bereich eine tiefe Rinne bilden.

Alle oben erwähnten Argumente sind nun mit der Vorstellung in Einklang, daß diese durch den Kontakt der beiden großen Untereinheiten gebildete Rinne den zentralen katalytischen Bereich der RNA Polymerase darstellt. Dabei legt die im ternären Transkriptionskomplex von Kumar und Krakow (1975) und von

Rohrer und Zillig (1977) beobachtete Resistenz von kurzen Ribo- oder Desoxyribo-Oligonucleotiden gegenüber der Wirkung von RNasen und DNasen nahe, daß die wachsende RNA und die komplementäre Matrize in dieser Rinne vor dem Abbau hydrolytischer Enzyme geschützt sind.

Die vorausgehenden Überlegungen über die Wirkung und den Bindungsort von Rifampicin stützen die Hypothese, daß sich das Antibiotikum direkt an den Produktbindungsbereich des RNA Polymerase-DNA-Komplexes anlagert und somit die Bindung der wachsenden RNA-Kette an diesen durch die Konformation des ternären Transkriptionskomplexes abgeschirmten RNA-Bindungsbereich inhibiert. Dies erklärt den experimentellen Befund, daß sich die Rifampicin-Bindungsstelle tief in das Enzym hinein erstreckt (Stender und Scheit, 1977).

Die vorliegenden Untersuchungen sind somit damit in Einklang, daß die Bindung von Rifampicin an die RNA Polymerase aus Escherichia coli einen zentralen Bereich des katalytischen Zentrums des Enzym beeinflußt. Dies macht nicht nur die hohe Spezifität des Antibiotikums (Hartmann et al.,1967; Fig. 4), sondern gleichermaßen den komplexen Einfluß vieler Reaktionskomponenten wie DNA (Lill et al., 1970; vgl. auch Ergebnisse, Kap. V.A, Anm. 20), in vitro synthetisierter oder exogen zugegebener RNA (Sippel und Hartmann, 1968; Lill und Hartmann, 1973; Ergebnisse, Kap. V) als auch der für die Initiation notwendigen Ribonucleosidtriphosphate ATP und UTP (Fig. 33) bei der Anlagerung des Wirkstoffs an die Escherichia coli RNA Polymerase verständlich.

Literaturverzeichnis

Anthony, D.D., Zeszotek, E. and Goldthwait, D. A. (1966) "Initiation by the DNA-Dependent RNA Polymerase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 1026 - 1033

Anthony, D. D., Wu, C. W. and Goldthwait, D. A. (1969a) "Studies with the Ribonucleid Acid Polymerase II. Kinetic Aspects of Initiation and Polymerisation", Biochemistry 8, 246 - 256

Anthony, D. D., Zeszotek, E. and Goldthwait, D. A. (1969b) "Studies with the RNA Polymerase I. Factors Affecting the Binding of Nucleic Acid Polymers to the Enzyme", Biochim. Biophys. Acta 174, 458 - 475

Applequist, J. and Damle, V. (1966) "Thermodynamics of the One-Stranded Helix-Coil Equilibrium in Polyadenylic Acid", J. Am. Chem. Soz. 88, 3859 - 3900

Armstrong, V., Sternbach, H. and Eckstein,F. (1974) "Attempts to Affinity Label DNA-Dependent RNA Polymerase with 5-Formyl-UTP", Abstr. Comm. 9th Meeting Fed. Eur. Biochem. Soc., Budapest, p. 176

Avila, J., Hermoso, J. M., Viñuela, E. and Salas, M. (1971) "Purification and Properties of DNA-Dependent RNA Polymerase from B. subtilis Vegetative Cells", Eur. J. Biochem. 21, 526 - 535

Axelrod, N. (1976) "Transkription of Bacteriophage φX 174 in Vitro: Selective Initiation with Oligonucleotides", J. Mol. Biol. 108, 753 - 770

Bähr, W., Stender, W., Scheit, K.-H. and Jovin, T. W. (1976) "Binding of Rifampicin to Escherichia coli RNA Polymerase: Thermodynamic and Kinetic Studies", in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M. J., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, p. 369 - 396

Bangerter, B. W. and Chan, S. I. (1969) "Proton Magnetic Resonance Studies of Ribose Dinucleoside Monophosphates in Aqueous Solution II. The Nature of the Base-Stacking Interaction in Adenyl-(3'-5')-cytidine and Cytididyl-(3'-5')-adenosine", J. Am. Chem. Soz. 91, 3910 - 3921

Baralle, F. E. and Travers, A. (1976) "Phage T4 Infection Restricts rRNA Synthesis by E. coli RNA Polymerase", Mol. Gen. Genet. 147, 291 - 297

Bass, I. A. and Polonsky, Y. S. (1974) "On the Fidelity of in vitro Polynucleotide Synthesis by E. coli RNA Polymerase", FEBS Lett. 48, 306 - 309

Bautz, E. K. F. and Bautz, F. A. (1970) "Initiation of RNA-Synthesis: The Function of σ in the Binding of RNA Polymerase to Promotor Sites", Nature 226, 1219 - 1222

Bautz, E. K. F., Bautz, F. A. and Beck, E. (1972) "Spezificity of σ-Dependent Binding of RNA Polymerase to DNA" Mol. Gen. Genet. 118, 199 - 207

Bautz, E. K. F., Dunn, J. J., Bautz, F. A., Schmidt, D. A. and Mazaitis, A. J. (1970) "Initiation and Regulation of Transkription by RNA Polymerase", in "Lepetit Colloquium on RNA Polymerase and Transcription" (Silvesri, L., ed.), North Holland Publishing Co., Amsterdam, London, Vol. 1, p. 90 - 109

Beabealashvilly, R. S., Ivanov, V. I., Minchenkova, L. E. and Savotchkina, L. P. (1972) "RNA Polymerase-DNA Complexes I. The Study of the Conformation of Nucleic Acids at the Growing Point of RNA in an RNA Polymerase-DNA System", Biochim. Biophys. Acta 259, 35 - 40

Bensadorm, A. and Weinstein, D. (1976) "Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials", Anal. Biochem. 70, 241 - 250

Berg, D., Barrett, K. and Chamberlin, M. (1971) "Purification of Two Forms of Escherichia coli RNA Polymerase and of Sigma Component", in "Methods of Enzymology" (Grossmann, L. and Moldave, K., eds.), Academic Press, New York and London, Vol. XXI, p. 506 - 519

Bick, M. D. (1975) "Misincorporation of GTP Duting Transcription of Poly dAT-dAT and Poly dABU-ABU", Nucleic Acids Res. 2, 1513 - 1523

Binda, G., Domenichini, A., Gottardi, B., Orlandi, B., Ortelli, E., Pacini, B. and Fowst, G. (1971) "Rifampicin, a General Review", Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 21, 1907 - 1977

Bishop, J., O. (1969) "Transcription of Denatured T4 DNA", Biochim. Biophys. Acta 174, 636 -652

Blumenthal, T. and Landers, T. (1973) "The Inhibition of Nucleic Acid-Binding Proteins by Aurintricarboxylic Acid", Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 680 - 688

Bock, R. M., Ling, N.-S., Morell, S. A. and Lipton, S. H. (1956) "Ultraviolet Absorption Spectra of Adenosine-5'-Triphosphate and Related 5'-Ribonucleotides", Arch. Biochem. Biophys. 62, 253 - 264

Bordier, C. (1974) "Inhibition of Rifampicin-Resistant RNA Synthesis by Rifampicin-RNA Polymerase Complexes", FEBS Lett. 45, 259 - 262

Bremer, H. and Konrad, M. W., (1964) "A Complex of Enzymatically Synthesized RNA and Template DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 801 - 808

Bremer, H., Yegian, C. and Konrad, M. (1965) "Inactivation of Purified Escherichia coli RNA Polymerase by Transfer RNA", L. Mol. Biol. 16, 94 - 103

Brufani, M., Cerrini,S., Fedili, W. and Vaciago, A (1974) "Rifamycins: An Insight into Biological Activity Based on Structural Investigations", J. Mol. Biol. 87, 409 - 435

Brufani, M., Fedeli, W., Giacomello, G. and Vaciago, A. (1964) "The X-Ray Analysis of the Structure of Rifamycin B", Experientia 20, 339 - 342

Burgess, R., R. (1969) "Separation and Characterisation of the Subunits of Ribonucleic Acid Polymerase", J. Biol. Chem. 344, 6168 - 6176

Burgess, R. R. and Jendrisak, J. J. (1975) "A Procedure for the Rapid, Large-Scale Purification of Escherichia coli DNA-Dependent RNA Polymerase Involving Polymin P Precipitation and DNA-Cellulose Chromatography", Biochemistry 14, 4634 - 4638

Burgess, R. R. and Travers, A. A. (1971) "Purification of the RNA Polymerase Sigma Factor", in "Methods in Enzymology" (Grossmann, L. and Moldave, K., eds.), Academic Press, New York and London, Vol. XXI, p. 500 - 506

Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J. and Bautz, E. K. F. (1969) "Factor Stimulating Transcription by RNA Polymerase", Nature 221, 43 - 46

Cantor, C. R. and Tinoco Jr., I. (1965) "Absorption and Optical Rotatory Dispersion of Seven Trinucleoside Diphosphates", J. Mol. Biol. 13, 65 - 77

Chamberlin, M. J. (1976) "RNA Polymerase - An Overview", in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M. J., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, p. 40 ff

Chamberlin, M. and Berg, P. (1964) "Mechanism of RNA Polymerase Action: Characterisation of the DNA-Dependent Synthesis of Polyadenylic Acid", J. Mol. Biol. 8, 708 - 726

Chamberlin, M., McGrath, J. and Waskell, L. (1970) "New RNA Polymerase from Escherichia coli infected with Bacteriophage T7", Nature 228, 227 - 231

Chamberlin, M. J. and Patterson, D. L. (1965) "Physical and Chemical Characterisation of the Ordered Complexes Formed Between Polyinosinic Acid, Polycytidylic Acid and their Deoxyribo-Analogues", J. Mol. Biol. 12, 410 -428

Chambon, P., Ramuz, M., Mandel, P. and Doly, J. (1967) "Inhibition of RNA Polymerase by Sodium Polyethylene Sulfonate", Biochim. Biophys. Acta 149, 584 - 586

Chamberlin, M. J. and Ring, J. (1972) "Studies of the Binding of Escherichia coli RNA Polymerase to DNA V. T7 RNA Chain Initiation by Enzyme-DNA Complexes", J. Mol Biol. 70, 221 - 237

Claeys, J. V., Miller, J. H., Kischbaum, J. B., Nasi, S., Molholt, B., Gross, G., Fields, D. A. and Bautz, E. K. F. (1976) "Altered RNA Polymerases Resulting from rif-Region of the E. coli Chromosome", Alfred Benzon Symposium IX on "Control of Ribosome Synthesis", Munksgaard, Copenhagen, p. 56 - 65

Cleland, W. W. (1963) "The Kinetics of Enzyme-Catalyzed Reactions with Two or More Substrates or Products II. Inhibition: Nomenclature and Theory", Biochim. Biophys. Acta 67, 173 - 187

Darlix,J. L., and Fromageot, P. (1972) "Discontinous in vitro Transcription of DNA", Biochimie 54, 47 - 54

Dausse, J.-P., Sentenac, A. and Fromageot, P. (1972) "Interaction of RNA Polymerase from Escherichia coli with DNA. Selection of Initiation Sites on T7 DNA", Eur. J. Biochem. 26, 43 - 49

Dausse, J.-P., Sentenac, A. and Fromageot, P. (1975) "Interaction of RNA Polymerase from Escherichia coli with DNA", Eur. J. Biochem. 57, 569 - 578

Dausse, J.-P., Sentenac, A. and Fromageot, P. (1976) "Interaction of RNA Polymerase from E. coli with DNA. Effect of Temperature and Ionic Strength on Selection of T7 DNA Early Promoters", Eur. J. Biochem. 65, 387 - 393

Davis, R. and Hyman, R. (1970) "Physical Locations of the in vitro RNA Initiation Site and Termination Sites of T7 M DNA", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 269 - 281

Davis, R. and Hyman, R. (1970) "Physical Location of the in vitro RNA Initiation Site and Termination Sites of T7 M DNA", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 269 - 281

Dean, W. and Lebowitz, J. (1971) "Partial Alteration on Secondary Structure in Native Superhelical DNA", Nature New Biol. 231, 5 - 8

Domingo, E., Escarmis, C. and Warner, R. C. (1975) "Transcription of Azotobacter Phage Desoxyribonucleic Acid. Salt-Dependent Equilibrium Between Steps in Initiation", J. Biol. Chem. 250, 2872 - 2877

Downey, K. M., Jurmark, B. S. and So, A. G. (1971) "Determination of Nucleotide Sequences at Promoter Regions by the Use of Dinucleotides", Biochemistry 10, 4970 - 4975

Dunn, J. J., Bautz, F. A. and Bautz, E. K. F. (1971) "Different Template Spezifities of Phage T3 and T7 RNA Polymerases", Nature New Biol. 230, 94 - 96

Dunn, J. J. and Studier, F. W. (1973) "T7 Early RNAs are Generated by Site-Spezific Cleavages", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1559 - 1563

Edgar, R. S. and Wood, W. B. (1966) "Morphogenesie of Bacteriophage T4 in Extracts of Mutant-Infacted Cells", Proc. Natl. Acad. Sci. 55, 498 - 505

Eilen, E. and Krakow, J. S. (1973) "Azotobacter vinelandii RNA Polymerase XI. Effect of Transcription on Rifampicin Binding", Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 282 - 290

Erikson, R. L. (1966) "Fractionating of Viral-Spezific Ribonucleic Acid by Caesium Sulfate Equilibrium Density-Gradient Centrifugation", L. Mol. Biol. 18, 372 - 381

Escarmis,C., Domingo, E. and Warner, R. C. (1975) "Temperature and Salt Effects on the Formation of Preinitiation Complexes Between RNA Polymerase and Phage DNA", Biochim. Biophys. Acta 402, 261 - 269

Fox, C. F., Gumport, R. I. and Weiss, S. B. (1965) "The Enzymatic Synthesis of Ribonucleic Acid V. The Interaction of Ribonucleic Acid Polymerase with Nucleic Acids", J. Biol. Chem. 240, 2101 - 2109

Frischauf, A. M. and Scheit, K.-H. (1973) "Affinity Labelling of E. coli RNA Polymerase with Substrate and Template Analogues", Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 1227 - 1233

Fromm, H. J. (1975) "Initial Rate Enzyme Kinetics: Use of Competitive Substrate Analogs and Alternative Substrates for Studying Kinetic Mechanisms", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 83 - 120

Fuchs E., Millette, R. L., Zillig, W. and Walter, G. (1967) "Influence of Salts on RNA Synthesis by DNA-Dependent RNA-Polymerase from Escherichia coli", Eur. J. Biochem. 3, 183 - 193

Fukuda, R. and Ishihama, A. (1971) "Isolation of an RNA Polymerase-DNA Complex by CsCl Equilibrium Centrifugation", Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 1255 - 1261

Fukuda, R. and Ishihama, A. (1974) "Subunits of RNA Polymerase in Function and Structure V. Maturation in vitro of Core Enzyme from E. coli", J. Mol. Biol. 87, 523 - 540

von Gabain, A. and Bujard, H. (1977) "Interaction of E. coli RNA Polymerase with Promoters of Coliphage T5. The Rates of Complex Formation and Decay and their Correlation with in vitro and in vivo Transcriptional Activity", Mol. Gen. Genet. 157, 301 - 311

von Gabain, A. and Bujard, H. (1979) "Interaction of Escherichia coli RNA Polymerase with Promoters of Several Coliphage and Plasmid DNAs", Ptoc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 189 - 193

Geiduschek, E. P. and Sklar, J. (1969) "Role of Host RNA Polymerase in Phage Developement", Nature 221, 833 - 836

Giacomoni, P. U. (1976) "A Reinterpretation of the Dissoziation Kinetics of the DNA-RNA Polymerase Complex Measured by the Filter Retention Assay", FEBS Lett, 72, 83 - 86

Gilbert W. (1976) "Starting and Stopping Sequences for the RNA Polymerase", in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M. J., eds.), Cold Spring Harbor Labotatory , p. 193 - 205

Gilbert, W, Maizels, N. and Maxam, A. (1974) "Sequences of Controlling Regions of the Lactose Operon", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 845 - 855

Goff, C. (1974) "Chemical Sructure of a Modification of the E. coli Ribonucleic Acid Polymerase α Polypeptides Induced by Bacteriophage T4 Infection", J. Biol. Chem. 249, 6181 - 6190

Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Seikichi, I. and Singh, R. M. M. (1966) "Hydrogen Ion Buffers for Biological Research", Biochemistry 5, 467 - 477

Gross, G., Fields, D. A. and Bautz, E. K. F. (1976) "Characterisation of a tsβ' Mutant RNA Polymerase of Escherichia coli", Mol. Gen. Genet. 147, 337 - 341

Handschin, J. C. and Wehrli, W. (1976) "On the Kinetics of the Rifampicin-RNA-Polymerase Complex. Differences Between Crude and Purified Enzym Fractions", Eur. J. Biochem. 66, 309 - 317

Hartmann, G. R. (1976a) "Über die biochemische Wirkungsweise von Antibiotika am Beispiel der Rifampicine", Hippokrates 47, 3 - 15

Hartmann, G. R. (1976b) "Austausch von Untereinheiten zwischen Enzymen aus verschiedenen Organismen in vitro: Enzymchimären", Angew. Chem. 88, 197 - 203

Hartmann, G., Honikel, K. O., Knüsel, F. and Nüesch, J. (1967) "The Specific Inhibition of the DNA-Directed RNA Synthesis by Rifampicin", Biochim. Biophys. Acta 145, 843 - 844

Haselkorn, R. and Rothman-Denes, L. B. (1973) "Protein Synthesis", Ann. Rev. Biochem. 42, 379 - 438

Haselkorn, R., Vogel, M. and Brown, R. D. (1969) "Conservation of the Rifamycin Sensitivity of Transcription During T4 Development", Nature 221, 836 - 838

Hayashi, M (1965) "A DNA-RNA Complex as an Intermediate of In Vitro Genetic Transcription", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1736 - 1743

Hayward, R. S. (1976) "DNA Blockade by Rifampicin-Inactivated Escherichia coli RNA Polymerase, and Its Amelioration by a Specific Mutation", Eur. J. Biochem. 71, 19 - 24

Heil, A. and Zillig, W. (1970) "Reconstitution of Bacterial DNA-Dedendent RNA-Polymerase from isolated Subunits as a Tool for the Elucidation of the Role of the Subunits in Transcription", FEBS Lett. 11, 165 - 168

Herzfeld, F. and Rath, N. (1974) "Subunit Structure of DNA-Dependent RNA Polymerase of Anacystis nidulans", Biochim. Biophys. Acta 374, 431 - 437

Heumann, H. (1978) "Untersuchungen über Transkription", Dissertation, Fachbereich Pharmazie der Ludwig-Maximillians-Universität München, München, p. 80 ff

Hillel, Z. and Wu, C.-W. (1977) "Subunit Topography of RNA Polymerase from Escherichia coli. A Cross-Linking Study with Bifunctional Reagents", Biochemistry 16, 3334 - 3342

Hillel, Z. and Wu, C.-W. (1978) "Photochemical Cross-Linking Studies on the Interaction of Escherichia coli RNA Polymerase with T7 DNA", Biochemistry 17, 2954 - 2961

Hinkle, D. C. and Chamberlin, M. J. (1972) "Studies of the Binding of Escherichia coli RNA Polymerase to DNA I. The Role of Sigma Subunit in Site Selection", J. Mol. Biol. 70, 157 - 185

Hinkle, D. C., Mangel, F. W. and Chamberlin, M. J. (1972) "Studies of the Binding of Escherichia coli RNA Polymerase to DNA IV. The Effect of Rifampicin on Binding and on RNA Chain Initiation", J. Mol. Biol. 70, 209 - 220

von Hippel, P. and Wong, K.-Y. (1971) "Dynamic Aspects of Native DNA Structure: Kinetics of the Formaldehyde Reaktion with Calf Thymus DNA", J. Mol. Biol. 61, 587 - 613

Hoffmann, D. J. and Niyogi, S. K. (1973) "RNA Initiation with Dinucleoside Monophosphates During Transcription of Bacteriophage T4 DNA with RNA Polymerase of Escherichia coli", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 574 - 578

Horvitz, H. R. (1973) "Polypeptide Bound to the Host RNA Polymerase is Spezified by T4 Control Gene 33", Nature New Biol. 244, 137 - 140

Hsieh, T.-s. and Wang, J. C. (1978) "Physicochemical Studies on Interactions Between DNA and RNA Polymerase. Ultraviolet Absorption Measurements", Nuc. Acids Res. 5, 3337 - 3345

Hurwitz, J., Bresler, A. and Diringer, R. (1960) "The Enzymic Incorporation of Ribonucleotides into Polyribonucleotides and the Effect of DNA", Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 15 - 19

Inove, Y., Aoyagi, S. and Nakanishi, K. (1967) "Oligonucleotide Studies III. Optical Rotatoty Dispersion of Seven Trinucleotides Obtained from Ribonuclease T1 Digests", J. Am. Chem. Chem. Soz. 89, 5701 - 5706

Iida, H., Ikehara, K. and Okada, Y. (1979) "Differenzial Transkription of fd RF I DNA by Caulobacter crescentus and Escherichia coli RNA Polymerase", FEBS Lett. 99, 346 - 350

Jencks, W. P., Cordes, S. and Carriulo, J. (1960) "The Free Energy of Thiol Ester Hydrolysis", J. Biol. Chem. 235, 3608 - 3614

Johnston, D. E. and McClure, W. R. (1976) "Abortive Initiation of In Vitro RNA Synthesis on Bacteriophage λ DNA", in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M. J., eds.), Cold Spring Harbour Laboratory, p. 413 - 428

Jones, O. W. and Berg, P. (1966) "Studies on the Binding of RNA Polymerase to Polynucleotides", J. Mol. Biol. 22, 199 - 209

Jovin, T. M. and Scheit, K.-H. (1975) "Interactions of Escherichia coli RNA Polymerase and its Substrate. Biochemical and Biophysical Studies", in "Biochemistry of the Cell Nucleus. Mechanism and Regulation of Gene Expression" (Hidvégi, E. J., Sumegi, J. and Venetianer, P., eds.), Akademia Kiado, Budapest, Vol. 33, p. 253 - 266

Kassavetis, G. A., Kaya, K. M. and Chamberlin, M. J. (1978) "Escherichia coli RNA Polymerase-Rifampicin Complexes Bound at Promoter Sites Block RNA Chain Elongation by Escherichia coli RNA Polymerase and T7-Spezific RNA Polymerase", Biochemistry 17, 5798 - 5840

Kerrich, R. E. (1973) "The Influence of Temperature on the Rifampicin Resistant Activity of RNA Polymerase", Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät der Julius-Maximilian- Universität Würzburg, Würzburg, p. 35 - 37

Kerrich-Santo, R. E. and Hartmann, G. R. (1974) "Influence of Temperature on the Action of Rifampicin on RNA Polymerase in Presence of DNA", Eur. J. Biochem. 43, 521 - 532

Kersten, H and Kersten, W. (1974) "Inhibitors of Nucleic Acid Synthesis. Biophysical and Biochemical Aspects", in "Mol. Biol. Biochem. Biophys."(Kleinzeller, A., Springer, G. F. and Wittmann, H. G., eds.), Vol. 18, p. 40 - 67

Kessler, C. (1976) "Die rifampicininduzierte Synthese von Dinucleosidtetraphosphat", Diplomarbeit, Fachbereich Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, München

Kessler, C. and Hartmann, G. R. (1977) "The Two Effects of Rifampicin on the RNA Polymerase Reaction", Biochem. Biophys. Res. Comm. 74, 50 - 56

Khesin, R. B., Astaurova, O. B., Shemyakin, M. F., Kamsolova, S. G. and Manyakov, V. F. (1967) "Changes in RNA Polymerase Properties During Binding to DNA and Initiation of RNA Synthesis", Mol. Biol. 1, 617 - 630

Khesin, R. B., Gorlenko, Z. M., Shemyakin, M. F., Stolinsky, S. L., Mindlin, S. Z. and Ilyina, T. S. (1969) "Studies on the Functions of the RNA Polymerase Components by Means of Mutations", Mol. Gen. Genet. 105, 243 - 261

Khesin, R. B., Nikiforov, V. G., Zograff, Y. N., Danilevskaya, O. N., Kalyaeva, E. S., Lipkin, V. M., Modyanov, N. N., Dmitriev, A. D., Velkov, V. V. and Gintsburg, A. L. (1976) "Influence of Mutations and Phage Infection on E. coli RNA Polymerase", in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M. J., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, p. 629 - 643

King, A. M. Q., Lowe, P. A. and Nicholson, B. H. (1974) "Specific Tryptic Cleavage of Escherichia coli Ribonucleic Acid Polymerase and the Establishment of β, β' and σ Subunit Contact", Biochem. Soc. Trans. 2, 76 - 78

Knopf, U. C. (1974) "The Nucleoside Triphosphate-Ribonucleic Acid Nucleotidyltransferase of Agrobacterium tumefaciens (Smith and Townsend) Conn.", Biochem. J. 143, 511 - 520

Konze-Thomas, B. and Rüger, W. (1976) "Functional Hybrid Enzymes Reconstituted from Escherichia coli and Serratia marcescens RNA Polymerase Subunits", Eur. J. Biochem. 63, 321 - 329

Kosaganov, Y., Zarudnaya, M. I., Lazurkin, Y. S., Frank-Kamenetskii, M. D., Beababealashvilly, R. S. and Savochkina, L. P. (1971) "Local Unwinding of DNA During RNA Synthesis in vitro", Nature New Biol. 231, 212 - 214

Krakow, J. S. and Fronk, E. (1969) "Azotobacter vinelandii Ribonucleic Acid Polymerase VIII. Pyrophosphate Exchange", J. Biol. Chem. 244, 5988 - 5993

Krakow, J. S. and von der Helm, K. (1970) "Azotobacter RNA Polymerase Transitions and the Release of Sigma", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 73 - 83

Krakow, J. S., Rhodes, G. and Jovin, T. M. (1976) "Catalytic Mechanisms and Inhibitors", in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M. J., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, p. 12 - 157

Kramer, R., Rosenberg, M. and Steiz, J. (1974) "Nucleotide Sequences of the 5' and 3' Termini of Bacteriophage T7 Early Messenger RNAs Synthesized in vivo: Evidence for Sequence Specificity in RNA Processing", J. Mol. Biol. 89, 767 - 776

Kumar, S. A. and Krakow, J. S. (1975) "Studies on the Product Binding Site of the Azotobacter vinelandii Ribonucleic Acid Polymerase", J. Biol. Chem. 250, 2878 - 2884

Lawley, P. D. and Brookes, P. (1963) "Further Studies on the Alkylation of Nucleic Acids and their Constituent Nucleotides', Biochem. J. 89, 127 - 128

Lechner, S. "Untersuchungen über die Abdissoziation der Sigma-Untereinheit von der Escherichia coli und Micrococcus luteus RNA-Polymerase", Dissertation, Fachbereich für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, München (in Vorbereitung)

Lehmann, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S. and Kornberg, A. (1958) "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid I. Preparation of Substrates and Partial Purification of an Enzyme from Escherichia coli", J. Biol. Chem. 233, 163 - 170

Leib, C. (1979) "Vergleich der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus Micrococcus luteus und Escherichia coli mit Peptid- und Immunchemischen Methoden", Dissertation, Fachbereich Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, München

Leng, M. and Felsenfeld, G. (1966) "A Study of Polyadenylic Acid at Neutral pH", J. Mol. Biol. 15, 455 - 466

Lill, H. R. (1973) "Wirkung von Proteasen auf Funktion, Aufbau und Gestalt der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus Escherichia coli", Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, p. 62 ff

Lill, H. R. and Hartmann, G. R. (1975) "Digestion with Matrix-Bound Proteases as a Possible Probe for the Topography of the DNA-Dependent RNA Polymerase", Eur. J. Biochem. 54, 45 - 53

Lill, H., Lill, U., Sippel, A. and Hartmann, G. (1970) "The Inhibition of the RNA-Polymerase Reaction by Rifampicin", in "RNA Polymerase and Transcription. Proceedings of the First International Lepetit Colloquium" (Silvestri, L., ed.), North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London, Vol. I, p. 55 - 64

Lill, U. I., Behrendt, E. M. and Hartmann, G. R. (1975) "Hybridisation in vitro of Subunits of the DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli and Micrococcus luteus", Eur. J. Biochem. 52, 411 - 420

Lill, U. I. and Hartmann, G. R. (1973) "On the Binding of Rifampicin to the DNA-Directed RNA Polymerase from Escherichia coli", Eur. J. Biochem. 38, 336 - 345

Lill, U. I. and Hartmann, G. R. (1977) "Formation of a RNA Polymerase Sub-Assembly Composed of Subunit α from Escherichia coli and the Subunit β from Micrococcus luteus", Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1605 - 1608

Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) "The Determination of Enzyme Dissociation Constants", J. Am. Chem. Soz. 56, 658 - 666

Loev, B. and Goodman, M. M. (1967) "Dry-Column Chromatography: A Preparative Chromatographic Technique with the Resolution of Thin-Layer Chromatography", Chem. Ind., p. 2026 - 2032

Loev, B. and Snyder, K. M. (1965) "Dry-Column Chromatography. A. Preparative Chromatographic Technique with the Resolvability of Thin-Layer Chromatography", Chem. Ind., p. 15 - 16

Losick, R. and Pero, J. (1976) "Regulatory Subunits of RNA Polymerase", in RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M. J., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, p. 227 - 246

Lowe, P. A. and Malcolm, A. D. B. (1976) "Rifampicin Binding as a Probe for Subunit Interactions in Escherichia coli RNA Polymerase", Biochim. Biophys. Acta 454, 129 - 137

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

Lozeron, H. A. and Szybalski, W. (1966) "Suppression of RNA Precipitation During Cs_2SO_4 Density Gradient Centrifugation", Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 612 - 618

MacDonald, R. C. and Rempas, S. P. (1977) "Dry Column Chromatography of Phospholipids", J. Chromatog. 131, 157 - 168

Maggi, N., Pallanza, R. and Sensi, P. (1965) "New Derivates of Rifamycin SV", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 765 - 769

Maggi, N., Pasqualucci, C. R., Ballotta, R. and Sensi, P (1966) "Rifampicin: A New Orally Active Rifamycin", Chemotherapia 11, 285 - 292

Mailhammer, R., Yang, H. L., Reiness, G. and Zubay, G. (1975) "Effects of Bacteriophage T4-Induced Modification of E. coli RNA Polymerase on Gene Expression in vitro", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4928 - 4932

Maitra, U. (1971) "Induction of a New RNA Polymerase in Escherichia coli Infected with Bacteriophage T3", Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 443 - 450

Maitra, U. and Barash, F. (1969) "DNA-Dependent Synthesis of RNA by Escherichia coli RNA Polymerase: Release and Reinitiation of RNA Chains from DNA Templates", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 779 - 786

Maitra, U. and Hurwitz, J. (1965) "The Role of DNA in RNA Synthesis IX. Nucleoside Triphosphate Termini in RNA Polymerase Products", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 815 - 822

Maitra, U. and Hurwitz, J. (1967) "The Role of Deoxyribonucleic Acid in Ribonucleic Acid Synthesis XIII. Modified Purification Procedure and Additional Properties of Ribonucleic Acid Polymerase from Escherichia coli W", J. Biol. Chem. 242, 4897 - 4907

Maitra, U., Lockwood, A. H., Dubnoff, J. S. and Guha, A. (1970) "Termination, Release, and Reinitiation of RNA Chains from Templates by Escherichia coli RNA Polymerase", Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 35, 143 - 156

Maizels, N. M. (1973) "The Nucleotide Sequence of the Lactose Messenger Ribonucleic Acid Transcribed from the UV 5 Promoter Mutant of Escherichia coli", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3585 - 3589

Makarova, O. V., Polonsky, Y. S., Zamchuk, L. A. and Zograf, Y. N. (1975) "Influence of Proteins Bound with Single-Stranded DNA on the Synthesis of RNA and Poly (A) I. Antibodies to DNA", Mol. Biol. 9, 861 - 870

Mangel, W. F. and Chamberlin, M. J. (1974a) "Studies of Ribonucleic Acid Chain Initiation by Escherichia coli RNA Polymerase Bound to T7 Deoxyribonucleic Acid I. An Assay for the Rate and Extent of Ribonucleic Acid Chain Initiation", J. Mol. Biol. 249, 2995 - 3001

Mangel, W. F. and Chamberlin, M. J. (1974b) "Studies of Ribonucleic Acid Chain Initiation by Escherichia coli RNA Polymerase Bound to T7 Deoxyribonucleic Acid II. The Effect of Alterations in Ionic Strength on Chain Initiation and on the Conformation of Binary Complexes", J. Biol. Chem. 249, 3002 - 3006

Mangel, W. F. and Chamberlin, M. J. (1974c) "Studies of Ribonucleic Acid Chain Initiation by Escherichia coli RNA Polymerase Bound to T7 Deoxyribonucleic Acid III. The Effect of Temperature on Ribonucleic Acid Chain Initiation and the Conformation of Binary Complexes", J. Biol. Chem. 249, 3007 - 3013

Margalith, P. and Beretta, G. (1960) "Rifomycin XI. Taxonomic Study on Streptomyces mediterranei Nov. SP.", Mycopathologia et Mycologia Applicata 13, 321 - 330

McClure, W. R. and Cech, C. L. (1978) "On the Mechanism of Rifampicin Inhibition of RNA Synthesis", J. Biol. Chem. 253, 8949 - 8956

McClure, W. R., Cech, C. L. and Johnston, D. E. (1978) "A Steady State Assay for the RNA Polymerase Initiation Reaction", J. Biol. Chem. 253, 8941 - 8948

McConnell, D. J. (1979) "The DNA Sequence at the T7 C Promoter", Nucleic Acids Res. 6, 525 - 544

McConnell, D. J. and Bonner, J. (1972) "Preparation of Highly Purified Ribonucleic Acid Polymerase: Separation From Polynucleotide Phosphorylase and Polyphosphate Kinase", Biochemistry 11, 4329 - 4336

McConnell, D. J. and Bonner, J. (1973) "Initiation Complexes of Escherichia coli RNA Polymerase and T7 DNA", Eur. J. Biochem. 38, 111 - 121

Melnikova, A. F., Beabealashvilli, R. S. and Mirzabekov, A. D. (1978) "A Study of Unwinding of DNA and Shielding of the DNA Grooves by RNA Polymerase by Using Methylation with Dimethylsulfat", Eur. J. Biochem. 84, 301 - 309

Michaelis, L. und Menten, M. L. (1913) "Die Kinetik der Invertinwirkung", Biochem. Z. 49, 333 - 369

Milanesi. G., Brody, E. N., Gran, O. and Geiduschek, E. P. (1970) "Transcription of the Bacteriophage *in vitro*: Separation of "Delayed-Early" from "Immediate-Early" Transcription", Proc. Natl. Acad. Sci. 66, 181 - 188

Miller, J. S. and Burgess, R. R. (1978a) "Selectivity of RNA Chain Initiation *in Vitro* 2. Correlation of 5'-Triphosphate-Labeled Oligonucleotides on Polyethylenimin Thin-Layer Chromatography with RNA Transcripts of Bacteriophage λcb2 and T7", Biochemistry 17, 2059 - 2064

Miller, J. S. and Burgess, R. R. (1978b) Selectivity of RNA Chain Initiation *in Vitro* 3. Varaiables Affecting Initiation of Transcription", Biochemistry 17, 2064 - 2069

Millette, R. L. and Trotter, C. D. (1970) "Initiation and Release of RNA by DNA-Dependent RNA Polymerase", Proc. Natl. Acad. Sci. 66, 701 - 708

Millette, R. L., Trotter, C. D., Herrlich, P. and Schweiger, M. (1970) "*In vitro* Synthesis, Termination, and Release of Active Messenger RNA", Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 35, 135 - 142

Minkley, E. G. and Pribnow, D. (1973) "Transcription of the Early Region of Bacteriophage T7: Selective Initiation with Dinucleotides", J. Mol. Biol. 77, 255 - 277

Müller, K. (1971) "The Function of the σ-Factor of *Escherichia coli* RNA Polymerase in Template Site Selection", Molec. Gen. Genet. 111, 273 - 296

Mueller, K. and Bremer, H. (1969) "Heterogenious Initiation and Termination of Enzymically Synthesized Ribonucleid Acid", J. Mol. Biol. 43, 89 - 107

Naito, S. and Ishihama, A. (1975) "Isolation and Properties of the Transcription Complex of *Escherichia coli* RNA Polymerase", Biochim. Biophys. Acta 402, 88 - 104

Nakanishi, S., Adhya, S., Gottesmann, M. and Pastan, T. (1974) "Activation of Transcription at Specific Promoters by Glycerol", J. Biol. Chem. 249, 4050 - 4056

Nakanishi, S., Adhya, S, Gottesmann, M. and Pastan, I. (1975) "Selective Effects of $MgCl_2$ and Temperature on the Initiation of Transcription at *lac*, *gal*, and λ Promoters", J. Biol. Chem. 250, 8202 - 8208

Nash, H. A. and Bradley, D. F. (1966) "Calculation of the Lowest Energy Configurations of Nucleotide Base Pairs on the Basis of an Electrostatic Model", J. Chem. Phys. 45, 1380 - 1386

Nikoforov, V. G. (1970) "RNA Polymerase from Thermophilic Strain of *B. megaterium*. Study on the Initiation of RNA Synthesis", Mol. Biol. 4, 159 - 174

Niyogi, S. K. and Stevens, A. (1965) "Studies of the Ribonucleic Acid Polymerase from Escherichia coli VI. Effect of Oligonucleotides on the Ribonucleic Acid Polymerase Reaction with Synthetic Polyribonucleotides as Templates", J. Biol. Chem. 240, 2593 - 2598

Nixon, J., Spoor, T., Evans, J. and Kimball. A. (1972) "Affinity Labelling of E. coli B Deoxyribonucleic Acid Dependent Ribonucleic Acid Polymerase", Biochemistry 11, 4570 - 4573

Novak, R. L. (1969) "Deoxyribonuclease-Resistant DNA in the Terminal Stages of RNA Polymerase-Reaction", Biochim. Biophys Acta 195, 279 - 281

Novak, R. L. and Doty, P. (1968) "The Resistance of Ribonucleic Acid Polymerase to Proteolytic Attack during Transcription in Vitro", J. Mol. Biol. 243, 6068 - 6070

Novak, R. L. and Doty, P. (1970) "Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism Studies on Escherichia coli Ribonucleic Acid Polymerase", Biochemistry 9, 1739 - 1743

Oen, H. and Wu, C.-W. (1978) "DNA-Dependent Single-Step Addition Reactions Catalyzed by Escherichia coli RNA Polymerase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1778 - 1782

Okada, M., Vergne, J. and Brahms, J. (1978) "Subunit Topography of RNA Polymerase (E. coli) in the Complex with DNA", Nuc. Acids Res. 5, 1845 - 1862

Oppolzer, W. und Prelog, V. (1973) "Über die Konstitution und die Konfiguration der Rifamycine B, O, S und SV", Helv. Chim. Acta 56, 2287 - 2314

Oppolzer, W., Prelog. und Sensi, P. (1964) "Konstitution des Rifamycins B und verwandter Rifamycine", Experientia 20, 336 - 339

Panny, S. R., Heil. A., Mazus, B., Palm, P., Zillig, W., Mindlin, S. Z., Ilyina, T. S. ans Khesin, R. B. (1974) "A Temperature Sensitive Mutation of the β'-Subunit of DNA-Dependent RNA Polymerase from E. coli T 16", FEBS Lett. 48, 241 - 245

Patrushev, L. I., Bocharova, T. N. and Khesin, R. B. (1978) "The Effect of Various Primers on RNA and Poly (A) Synthesis by E. coli and T7 RNA Polymerases", FEBS Lett. 86, 108 - 112

Pedone, F., Ballario, P. and Di Mauro, E. (1978) "Homologous RNA Polymerase Binding to Escherichia coli DNA. A Study of the Distribution of Stable Binding Sites", Eur. J. Biochem. 87, 445 - 451

Pfeffer, S. R., Stahl, S. J. and Chamberlin, M. J. (1977) "Binding of Escherichia coli RNA Polymerase to T7 DNA. Displacement of Holoenzyme from Promoter Complexes by Heparin", J. Biol. Chem. 252, 5403 - 5407

Prelog, V. und Oppolzer, W. (1973) "Ansamycine, eine neuartige Klasse von mikrobiellen Stoffwechselprodukten", Helv. Chim. Acta 56, 2279 - 2287

Pribnow, D. (1973) "Bacteriophage T7 Early Promoters: Nucleotide Sequences of Two RNA Polymerase Binding Sites", J. Mol. Biol. 99, 419 - 443

Pullmann, B. (1968) "Molecular Associations in Biology" (Pullmann, B., ed.), Academic Press, New York and London, p. 17

Randerath, K. and Randerath, E. (1964) "Ion-Exchange Chromatography of Nucleotides on Poly-(Ethylenimine)-Cellulose Thin Layers", J. Chromatog. 16, 111 - 125

Randerath, K. and Randerath, E. (1968) "Thin-Layer Separation Methods for Nucleic Acid Derivates", in "Methods in Enzymology" (Grossmann, L. and Moldave, K., eds.), Academic Press, New York and London, Vol. XII, p. 323 - 347

Ratner, D. (1974a) "The Interaction of Bacterial and Phage Proteins with Immobilized Escherichia coli RNA Polymerase", J. Mol. Biol. 88, 373 - 383

Ratner, D. (1974b) "Bacteriophage T4 Transcriptional Control Gene 55 Codes for a Protein Bound to Escherichia coli RNA Polymerase", J. Mol. Biol. 89, 803 - 807

Remold-O'Donnell, E. and Zillig, W. (1970) "Purification and Properties of DNA-Dependent RNA-Polymerase from Bacillus stearotermophilus", Eur. J. Biochem. 7, 318 - 323

Rhodes, G. and Chamberlin, M. J. (1974) "Ribonucleic Acid Chain Elongation by Escherichia coli Ribonucleic Acid Polymerase I. Isolation of Ternary Complexes and the Kinetics of Elongation", J. Biol. Chem. 249, 6675 - 6683

Rhodes, G. and Chamberlin, M. J (1975) "Kinetic Analysis of Ribonucleic Acid Chain Initiation by Escherichia coli Ribonucleic Acid Polymerase Bound to DNA", J. Biol. Chem. 250, 9112 - 9120

Richardson, C. C., Schildkraut, C. C., Aposhian, H. V. and Kornberg, A. (1964) "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid XIV. Further Purification and Properties of Deoxyribonucleic Acid Polymerase of Escherichia coli", J. Biol. Chem. 239, 222 - 232

Richardson, J. P. (1966a) "The Binding of RNA Polymerase to DNA", J. Mol. Biol. 21, 83 - 114

Richardson, J. P. (1966b) "Enzymic Synthesis of RNA from T7 DNA", J. Mol. Biol. 21, 115 - 127

Richardson, J. P. (1969) "RNA Polymerase and the Control of RNA Synthesis", Progr. Nuc. Acid Res. Mol. Biol. 9, 75 - 116

Richardson, J. P. (1970) "Reinitiation of RNA Chain Synthesis in vitro", Nature 225, 1109 - 1112

Richardson, J. P. (1975) "Initiation of Transcription by Escherichia coli RNA Polymerase from Supercoiled and Non-Supercoiled Bacteriophage PM 2 DNA", J. Mol. Biol. 91, 477 - 487

Riley, M., Maling, B. and Chamberlin, M. J. (1966) "Physical and Chemical Characterisation of Two- and Three-Stranded Adenine-Thymine and Adenine-Uracil Homopolymer Complexes", J. Mol. Biol. 20, 359 - 389

Riva, S. Fietta, A. and Silvestri. L. G. (1972) "Mechanism of Action of a Rifamycin Derivate (AF/013) Which is Active on the Nucleic Acid Polymerases Insensitive to Rifampicin", Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 1263 - 1271

de Robertis, E. M., Ezcurra, P. M., Judewicz, N. D., Pucci, P. R. and Torres, H. N. (1972) "Inhibition of E. coli RNA Polymerase by Polyadenylic Acid", FEBS Lett. 25, 175 - 178

Rohrer, H. and Zillig, W. (1977) "Studies on the Transcription Complex of Escherichia coli RNA Polymerase", Eur. J. Biochem. 79, 401 - 409

Rohrer, H., Zillig, W. and Mailhammer, R. (1975) "ADP-Ribosylation of DNA-Dependent RNA Polymerase of Escherichia coli by an NAD^+:Protein ADP-Ribosyl-Transferase from Bacteriophage T4", Eur. J. Biochem. 60, 227 - 238

Rose, I. A., O'Connell, E. L., Litwin, S. and Bartana, J. (1974) "Determination of the Rate of Hexokinase-Glucose Dissociation by the Isotope-Trapping Method", J. Biol. Chem. 249, 5163 - 5168

Rüger, W. (1975) "RNA Polymerase Binding Sites Isolated from T4 DNA: Analysis of Oligopyrimidine Sequences Constituting Preinitiation and Initiation Complexes", Mol. Gen. Genet. 139, 67 - 76

Rüger, W. (1978) "Transcription of Bacteriophage T4 DNA in vitro: Selective Initiation with Dinucleotides", Eur. J. Biochem. 88, 109 - 117

Ruet, A., Sentenac, A. and Fromageot, P. (1970) "On the Liberation of σ and the Molecular Weight of E. coli RNA Polymerase", FEBS Lett. 11, 169 - 171

Saucier, J.-M. and Wang, J. C. (1972) "Angular Alteration of the DNA Helix by E. coli RNA Polymerase", Nature 239, 167 - 170

Schachner, M. and Zillig, W. (1971) "Fingerprint Maps of Tryptic Peptides from Subunits of Escherichia coli and T4-Modified DNA-Dependent RNA Polymerases", Eur. J. Biochem. 22, 513 - 519

Schäfer, R. and Zillig, W. (1973) "The Effects of Ionic Strength on Termination of Transcription of DNAs from Bacteriophage T4, T5 and T7 by DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli and the Nature of Termination by Factor ρ", Eur. J. Biochem. 33, 215 - 226

Schäfer, R., Zillig, W. and Zechel, K. (1973) "A Model for the Initiation of Transcription by DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli", Eur. J. Biochem. 33, 207 - 214

Schaller, H., Nüsslein, C., Bonhoeffer, F. J., Kurz, C. and Nietschmann, I. (1972) "Affinity Chromatography of DNA-Binding Enzymes of Single-Stranded DNA-Agarose Colums", Eur. J. Biochem. 26, 474 - 481

Schmid, C. W. and Hearst, J. E. (1969) "Molecular Weights of Homogeneous Coliphage DNA's from Density-Gradient Sedimentation Equilibrium", J. Mol. Biol. 44, 143 - 160

Schuegraf, A., Ratner, S. and Warner, R. C. (1960) "Free Energy Changes of the Arginino-Succinate Synthetase Reaction and of the Hydrolysis of the Inner Pyrophosphate Bond of Adenosine Triphosphate", J. Biol. Chem. 235, 3597 - 3602

Seeburg, P. H., Nüsslein, C. and Schaller, H. (1977) "Interaction of RNA Polymerase with Promoters from Bacteriophage fd", Eur. J. Biochem. 74, 107 - 113

Sensi, P. (1975) "Recent Progress in the Chemistry and Biochemistry of Rifampicins", Pure Appl. Chem. 41, 15 - 29

Sensi, P., Greco, A. M. and Ballotta, R. (1960) "Rifamycin I. Isolation and Properties of Rifamycin B and Rifamycin Complex", Antibiotics Ann. 1595/60, 262 - 270

Sensi, P., Margalith, P. and Timbal, M. T. (1959) "Rifomycin, A New Antibiotic - Preliminary Report", Farmaco, Ed. Sci. 14, 146 - 147

Sethi, V. S. and Zillig, W. (1970) "Dissoziation and Reconstituation of Active DNA-Dependent RNA Polymerase from E. coli", FEBS Lett. 8, 236 - 239

Shapiro, A. L., Viñuela, E. and Maizel, J. V. (1967) "Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chain by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels", Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815 - 820

Shemyakin, M. F., Malygin, A. G. and Patrushev, L. I. (1978) "A Study of the Conditions of the First Phosphodiester Bond Formation by E. coli RNA Polymerase", FEBS Lett. 91, 253 - 256

Siebenlist, U. (1979a) "Nucleotide Sequence of the Three Major Early Promoters of Bacteriophage T7", Nuc. Acids Res. 6, 1895 - 1907

Siebenlist, U. (1979b) "RNA Polymerase Unwinds an 11-Base Pair Segment of a Phage T7 Promoter", Nature 279, 651 - 652

Sippel, A. (1973) "Purification and Characterization of Adenosine Triphosphate:Ribonucleic Acid Adenyltransferase from Escherichia coli", Eur. J. Biochem. 37, 31 - 40

Sippel, A. and Hartmann, G. (1968) "Mode of Action of Rifampicin on the RNA Polymerase Reaction", Biochim. Biophys. Acta 157, 218 - 219

Sippel, A, and Hartmann, G. (1970) "Rifampicin Resistance of RNA Polymerase in Binary Complex with DNA", Eur. J. Biochem. 16, 152 - 157

Slepneva, I. A., Zakharova, N. V. and Backer, J. M. (1978) "Kinetic Evidence for Multiple Binding Sites of Nucleoside Triphosphates in Escherichia coli RNA Polymerase", FEBS Lett. 87, 273 - 276

Smagowicz, W. J. and Scheit, K.-H. (1977) "Steady State Kinetic Studies of Initiation of RNA Synthesis on T7 DNA in the Presence of Rifampicin", Nuc. Acids Res. 4, 3863 - 3876

Smagowicz, W. J. and Scheit, K.-H. (1978) "Primed Abortive Initiation of RNA Synthesis by E. coli RNA Polymerase on T7 DNA, Steady State Kinetic Studies", Nuc. Acids Res. 5, 1919 - 1932

Smith, D. A. and Martinez, A. M. (1974) "Initiation of in vitro RNA Synthesis with Deoxyribosyl Oligomers", Biochim. Biophys. Acta 353, 475 - 486

Smith, D. A., Ratliff, R. L., Williams, D. L. and Martinez, A. M. (1967) "Synthesis of Polyadenylate: Polyuridylate Catalyzed by Ribonucleic Acid Polymerase in the Absence of a Template", J. Biol. Chem. 242, 590 - 595

So, A. G. and Downey, K. M. (1970) "Studies on the Mechanism of Ribonucleic Acid-Ribonucleic Acid Polymerase Complex by the Formation of a Single Phosphodiester-Bond", Biochemistry 9, 4788 - 4793

Solage, A. and Cedar, H. (1976) "The Kinetics of E. coli RNA Polymerase", Nuc. Acids Res. 3, 2207 - 2222

Spoor, T. C., Persico, F., Evans, J. and Kimball, A. P. (1970) "Recognition Sites Around the Catalytic Centre of DNA-Dependent RNA Polymerase", Nature 227, 57 - 59

Springgate, C. F. and Loeb, L. A. (1975) "On the Fidelity of Transcription by Escherichia coli Ribonucleic Acid Polymerase", J. Mol. Biol. 97, 577 - 591

Stahl, S. J. and Chamberlin, M. J. (1977) "An expanded Transcriptional Map of T7 Bacteriophage. Reading of Minor T7 Promoter Sites in Vitro by Escherichia coli RNA Polymerase", J. Mol. Biol. 112, 577 - 601

Stead, N. W. and Jones, O. W. (1967) "The Binding of RNA Polymerase to DNA: Stabilisation by Nucleoside Triphosphates", Biochim. Biophys. Acta 145, 679 - 685

Stender, W. and Scheit, K.-H. (1976) "Dissociation Kinetics of Complexes between the Antibiotic Rifamycin and DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli", Eur. J. Biochem. 65, 333 - 339

Stender, W. and Scheit, K.-H. (1977) "Studies of the Topography of the Binding Site of DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli for the Antibiotic Rifamycin SV", Eur. J. Biochem. 76, 591 - 600

Stender, W., Stutz, A. A. and Scheit, K.-H. (1975) "The Modification of DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli by an Alkylating Derivative of Rifamycin SV", Eur. J. Biochem. 56, 129 - 136

Stetter, K. O. and Zillig, W. (1974) "Transcription in Lactobacillaceae DNA-Dependent RNA Polymerase from Lactobacillus curvatus", Eur. J. Biochem. 48, 527 - 540

Stevens, A. (1961) "Net Formation of Polyribonucleotides with Base Compositions Analogous to Deoxyribonucleic Acid", J. Biol. Chem. 236, PC 43 - PC 45

Stevens, A. (1972) "New Small Polypeptides Assoziated with DNA-Dependent RNA Polymerase of Escherichia coli after Infektion with Bacteriophage T4", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 603 - 607

Stevens, A. and Henry, J. (1964) "Studies of the Ribonucleic Acid Polymerase from Escherichia coli", J. Biol. Chem. 239, 196 - 203

Straat, P. A., Pongs, O. and Ts'o, P. O. P.(1971) "RNA Polymerase from Micrococcus luteus: Comparative Effect of Ribosyl and Deoxyribosyl Oligomers on the Homopolymer-Directed Reaction", Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 905 - 911

Studier, F. W. (1969) "The Genetics and Physiology of Bacteriophage T7", Virology 39, 562 - 574

Studier, F. W. (1975) "Gene 0.3 of Bacteriophage T7 Acts to Overcome the DNA Restriction System of the Host", J. Mol. Biol. 94, 283 - 295

Surzycki, J. S., Surzycki, J. A., DeLorbe, W. and Gussin, G. N. (1976) "In vitro Transcription of Adenovirus 2 DNA", Mol. Gen. Genet. 143, 177 - 184

Tabak, H. F. and Borst, P. (1971) "Formation of Self-Complementary RNA on a Single Strand of DNA by RNA Polymerase from Escherichia coli", Biochim. Biophys. Acta 246, 450 - 457

Teitelbaum, H. and Englander, S. W. (1975) "Open States in Polynucleotides I. Hydrogen Exchange Study of Adenine Containing Double Helices", J. Mol. Biol. 92, 55 - 78

Terao, T., Dahlberg, J. E. and Khorana, H. G. (1972) Studies on Polynucleotides CXX. On the Transcription of a Synthetic 29-Unit Long Deoxyribopolynucleotide", J. Biol. Chem. 247, 6157 - 6166

Thiemann, J. E., Zucco, G. and Pelizza, G. (1969) "Proposal for the Transfer of Streptomyces mediterranei to the Genus Norcardia as Norcardia mediterranea", Arch. Mikrobiol. 67, 147 - 155

Thomas, C. and Abelson, J. (1966) "The Isolation and Characterisation of DNA from Bacteriophage", in "Procedures in Nucleic Acid Research" (Cantoni, D. L. and Davis, D. R., eds.), Harper, Row and Weatherhill, New York, Evaston, London und Tokyo, p. 553 - 561

Tissières, A., Bourgeois, S. and Gros, S. (1963) "The Inhibition of RNA Polymerase by RNA", J. Mol. Biol. 7, 100 - 103

Travers, A. (1970) "RNA Polymerase and T4 Development", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 241 - 251

Travers, A. (1974) "On the Nature of DNA Promoter Conformations. The Effects of Glycerol and Dimethylsulphoxide", Eur. J. Biochem. 47, 435 - 441

Travers, A. A. and Burgess, R. R. (1969) "Cyclic Re-Use of the RNA Polymerase Sigma Factor", Nature 222, 537 - 540

Ts'o, P. O. P., Kondo, N. S., Schweizer, M. P. and Hollis, D. P. (1969) "Studies of the Conformation and Interaction in Dinucleoside Mono- and Diphosphates by Proton Magnetic Resonance", Biochemistry 8, 997 - 1029

Wang, J. C. (1974) "Interactions between Twisted DNAs and Enzymes: The Effects of Superhelical Turns", J. Mol. Biol. 87, 797 - 816

Wang, J. C., Jacobsen, J. H. and Saucier, J.-M. (1977) "Physicochemical Studies on Interaction Between DNA and RNA Polymerase. Unwinding of the DNA Helix by Escherichia coli RNA Polymerase fd DNA", Nuc. Acids Res. 4, 1225 - 1241

Warshaw, M. M. and Tinoco Jr., I. (1966) "Optical Properties of Sixteen Dinucleoside Phosphates", J. Mol. Biol. 20, 29 - 38

Wehrli, W. (1977a) "Ansamycins. Chemistry, Biosynthesis and Bological Activity", Topics in Current Chemistry 72, 21 - 49

Wehrli. W. (1977b) "Kinetic Studies of the Interaction between Rifampicin and DNA-Dependent RNA Polymerase of Escherichia coli", Eur. J. Biochem. 80, 325 - 330

Wehrli, W., Handschin, J. and Wunderli, W. (1976) "Interaction between Rifampicin and DNA-Dependent RNA Polymerase of E. coli", in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M. J., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, p. 397 - 412

Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K. and Staehlin, M. (1968) "Interaction of Rifampicin with Bacterial RNA Polymerase", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 667 - 673

Wehrli, W. and Staehlin (1969) "The Rifamycins - Relation of Chemical Structure and Action on RNA Polymerase", Biochim. Biophys. Acta 182, 24 - 29

Wehrli, W. and Staehlin, M. (1971) "Actions of the Rifamycins", Bac. Rev. 35, 290 - 309

Wiggs, J. L., Bush, J. W. and Chamberlin, M. J. (1979) "Utilisation of Promoter and Terminator Sites on Bacteriophage T7 DNA by RNA Polymerases from a Variety of Bacterial Orders", Cell 16, 97 - 109

Witmer, H. J. (1971) "In Vitro Transcription of T4 Deoxynucleic Acid by E. coli Ribonucleotid Acid Polymerase: Sequential Transcription of Immidiate Early and Delayed Early Cistrons in the Absence of the Release Factor, Rho", J. Biol. Chem. 246, 5220 - 5227

Wu, C.-W. and Goldthwait, D. (1969a) "Studies of Nucleotide Binding to the Ribonucleic Acid Polymerase by a Fluorescence Technique", Biochemistry 8, 4450 - 4458

Wu, C.-W. and Goldthwait, D. (1969b) "Studies of Nucleotide Binding to the Ribonucleic Acid Polymerase by Equilibrium Dialysis", Biochemistry 8, 4458 - 4464

Wu, F. J.-H. and Wu, C.-W. (1973) "Rose Bengal: A Spectroscopic Probe for Ribonucleic Acid Polymerase", Biochemistry 12, 4349 - 4355

Wu, C.-W., Yarbrough, L. R., Hillel, Z. and Wu, F. J.-F. (1975) "Sigma Cycle during in vitro Transcription: Demonstration by Nanosecond Fluorescence Depolarisation Spectroscopy", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3019 - 3023

Wyatt, G. R. and Cohen, S. S. (1953) "The Bases of the Nucleic Acids of some Bacterial and Animal Viruses: The Occurrence of 5-Hydroxymethylcytosine", Biochem. J. 55, 774 - 782

Wyss, E. and Wehrli, W. (1976) "The Use of Dextran-Coated Charcoal for Kinetic Measurements: Interaction Between Rifampicin and DNA-Dependent RNA Polymerase of E. coli", Analyt. Biochem. 70, 547 - 553

Yarbrough, L. R. and Hurwitz, J. (1974) "The Isolation of Subunits of Deoxyribonucleic Acid-Dependent Ribonucleic Acid Polymerase of E. coli", J. Biol. Chem. 249, 5400 - 5404

Yarbrough, L. R., Wu, F. Y.-H. and Wu, C.-W. (1976) "Molecular Mechanism of the Rifampicin-RNA Polymerase Interaction", Biochemistry 15, 2669 - 2676

Zarudnaya, M. I., Kosaganov, Y. N., Lazurkin, Y. S., Frank-Kamenetskii, M. D. Beabealashvilli, R. S. and Savotchkina, L. P. "The Study of DNA-RNA Polymerase Complexes by Kinetic Formaldehyde Method", Eur. J. Biochem. 63, 607 - 615

Zechel, K. (1971) "Transkription in vitro: Untersuchungen zur Bindung und Initiation von RNA Polymerase an DNA", Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, München, p. 46 ff

Zillig, W., Palm, P and Heil, A. (1976) "Funktion and Reassembly of Subunits of DNA-Dependent RNA Polymerase", in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M. J., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, p. 101 - 125

Zillig, W., Stetter, K. O. and Janeković, D. (1979) "DNA-Dependent RNA Polymerase from Archaebacterium Sulfulobus acidocaldarius", Eur. J. Biochem. 96, 597 - 604

Zillig, W., Stetter, K. O. and Tobien, M. (1978) "DNA-Dependent RNA Polymerase from Halobacterium halobium", Eur. J. Biochem. 91, 193 - 199

Zillig, W., Zechel, K., Rabussay, D., Schachner, M., Sethi, V. S., Palm, P., Heil, A. and Seifert, W. (1970) "On the Rule of Different Subunits of DNA-Dependent RNA Polymerase from E. coli in the Transcription Process", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 47 - 58

Zimmer, S. G. and Millette, R. L. (1975) "DNA-Dependent RNA Polymerase from Pseudomonas BAL-31 I. Purification and Properties of the Enzyme", Biochemistry 14, 290 - 299

Zimmer, S. G. and Millette, R. L. (1979) DNA-Dependent RNA Polymerase from Pseudomonas BAL-31. Effect of and Template Homology on the Stimulation and Selectivity of Transcription", J. Biol. Chem. 254, 2199 - 2204

Zusammenfassung

1. E. coli RNA Polymerase Holoenzym katalysiert die matrizenabhängige Synthese sowohl von langkettiger RNA als auch von Dinucleosidtetraphosphat. Das Ausmaß der Katalyse dieser beiden Reaktionsprodukte ist nicht unabhängig voneinander und wird hauptsächlich durch die Konzentration der für die Elongation initiierter RNA-Ketten essentiellen Ribonucleosidtriphosphate GTP und CTP gesteuert. Die spezifische Wirkung von Rifampicin liegt darin, daß die Bildung langkettiger RNA fast vollständig inhibiert wird, während die Bildung von DNTP durch das Antibiotikum direkt nur wenig beeinflußt wird. Dies hat zur Folge, daß der Hemmstoff selbst bei hohen Konzentrationen aller vier Ribonucleosidtriphosphate die Katalyse von DNTP erzwingt. Weiterhin muß auch die Steigerung der DNTP-Syntheserate durch Rifampicin bei sehr kleinen GTP- und CTP-Konzentrationen auf den Primäreffekt der Inhibierung der RNA-Synthese zurückgeführt werden. Selbst in Abwesenheit dieser beiden Ribonucleosidtriphosphate bewirkt der Hemmstoff die vermehrte Bildung von DNTP nicht durch die direkte Erhöhung der Synthesegeschwindigkeit, sondern durch die spezifische Blockierung verschiedener noch in geringem Ausmaß ablaufenden RNA-Restsynthesen.

2. Die nur geringe Beeinflussung der DNTP-Syntheserate durch Rifampicin ist nahezu unabhängig von den Reaktionsparametern Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke. Unterschiede in den Bildungsraten können im wesentlichen auf die Blokkierung der in Abwesenheit des Antibiotikums möglichen RNA-Restsynthesen zurückgeführt werden.

3. Die starke Temperaturabhängigkeit der DNTP-Synthese kann weder durch einen permanenten Sigma-Kreislauf noch durch den Zerfall des Enzym-DNA-Komplexes während der Ablösung jedes gebildeten DNTP-Moleküls erklärt werden. Vielmehr ist die Ursache des starken Einflusses der Temperatur in einem zur RNA-Synthese analogen, den eigentlichen katalytischen Reaktionsschritten vorgela-

gerten temperaturabhängigen Gleichgewicht zwischen inaktiven und aktiven Zustandsformen des Praeinitiationskomplexes begründet. Dabei wird die Einstellung dieses Gleichgewichts durch Rifampicin nicht verhindert.

4. CTP und CMP reduzieren an T7 D111 DNA als Matrize die Syntheserate von pppApU. Jedoch ist die von CTP auf Grund der Weiterreaktion des initiierenden pppApU zum entsprechenden Trinucleotid hervorgerufene Reduktion der pppApU-Syntheserate größer als diejenige, die durch CMP verursacht wird. Dabei zeigt die Spezifität der Reduktion der pppApU-Syntheserate durch CMP und die beobachtete Abhängigkeit der CMP-Wirkung von den Reaktionsparametern Temperatur und Nucleotidkonzentration, daß die verminderte pppApU-Syntheserate in der Stabilisierung des Enzym-DNA-DNTP-Komplexes durch die zusätzliche Anlagerung des elongierenden Nucleotids begründet ist. Im Gegensatz dazu wird die pppApU-Bildung in Anwesenheit von Rifampicin sowohl durch CTP als auch durch CMP identisch jeweils um den Betrag herabgesetzt, der in Abwesenheit des Antibiotikums ausschließlich bei der Hemmung durch CMP beobachtet wird. Diese Identität der Reduktion der pppApU-Syntheserate durch CMP in An- und Abwesenheit des Hemmstoffs, die unabhängig von der Reaktionstemperatur und der CMP-Konzentration ist, verdeutlicht, daß Rifampicin die Anlagerung des elongierenden Nucleotids an den Transkriptionskomplex nicht verhindert.

5. Die Analyse der Wirkung von Rifampicin während der in vitro RNA-Synthese ergibt, daß die RNA Polymerase im Komplex mit der Matrize durch die Bildung von Ribonucleinsäure zunehmend gegenüber dem Angriff des Antibiotikums geschützt wird. Dabei zeigt die dauerhafte Stabilität des isolierten Transkriptionskomplexes in Abwesenheit der Substrate, daß die Stabilität der RNA Polymerase gegenüber Rifampicin während der laufenden in vitro Synthese von RNA auf die dauerhaft geschützte Konformation des Enzyms im ternären Komplex zurückgeführt werden muß.

6. Die im Vergleich zum freien Enzym weitaus geringere Hemmung derjenigen DNTP-Synthese durch exogene RNA, die durch den Rifampicin-Emzym-Komplex katalysiert wird, zeigt deutlich, daß die RNA Polymerase durch das Antibiotikum dauerhaft vor der inhibitorischen Wirkung exogener RNA geschützt wird. Umgekehrt kann auch die Anlagerung von Rifampicin durch schon an das freie Enzym gebundene exogene RNA ebenfalls dauerhaft weitgehend verhindert werden. Diese wechselseitige Beeinflussung ist spezifisch sowohl bezüglich des Antibiotikums als auch in Bezug auf exogene RNA.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
γ-[^{32}P]ATP	in Gammastellung mit [^{32}P] markiertes ATP
C	Celsius
[^{14}C]	Kohlenstoffisotop der Massenzahl 14
Ci	Curie
CMP	Cytosin-5'-monophosphat
Coreenzym	RNA Polymerase bestehend aus den Untereinheiten $\alpha\alpha\beta\beta'$
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
D	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DNTP	Dinucleosidtetraphosphat
DTE	Dithioerythrit
E	Coreenzym
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Eσ	Holoenzym
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
[^{3}H]	Tritium
Hep	Heparin
HEPES	N-2-Hydroxyäthyl-piperazin-N'-2-äthansulfonsäure
Holoenzym	RNA Polymerase bestehend aus den Untereinheiten $\alpha\alpha\beta\beta'\sigma$
Ipm	Impulse pro Minute

K	Kelvin
λ	Wellenlänge
λb2 DNA	Desoxyribonucleinsäure des Bacteriophagen λb2
mA	Milliampère
MG	Molekulargewicht
min	Minute
NAD^+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxydiert)
oD	optisch Dichte
$[^{32}P]$	Phosphorisotop der Massenzahl 32
PEI	Polyäthylenimin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pK_a	negativer dekadischer Logarithmus der Säure-Dissoziationskonstante
poly d(A-T)	3'-5'- Copolymeres der alternierenden Sequenz dA-dT
poly (glu, tyr)	Polypeptid bestehend aus äquimolaren Mengen Glutaminsäure und Tyrosin
poly I	Polyinosinsäure
poly rA	Polyadenylsäure
poly r(A-U)	3'-5'-Copolymeres der alternierenden Sequenz A-U
poly rA:rU	doppelsträngige RNA aus je einem Strang Polyadenylsäure und Polyuridylsäure
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
r $RNA_{E. coli}$	ribosomale Ribonucleinsäure aus Escherichia coli
R17 RNA	Ribonucleinsäure des Bacteriophagen R17
sec	Sekunde
t	Zeit
T	Temperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
T4 DNA	Desoxyribonucleinsäure des Bakteriophagen T4
T7 DNA	Desoxyribonucleinsäure des Bakteriophagen T7
T7 D111 DNA	Desoxyribonucleinsäure der Mutante D111 des Bacteriophagen T7
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
Vol.	Volumen
XTP	Ribonucleosid-5'-triphosphat

Lebenslauf

Am 2. Juni 1949 wurde ich als Sohn des Kirchenmusikers Franz Kessler und seiner Ehefrau, der Chemikerin Ilsetraut Kessler, geb. von Zelewski, in Wiesbaden geboren.

Von April 1955 bis April 1960 besuchte ich die Diesterweg-Volksschule und von April 1960 bis Oktober 1960 das humanistische Dilthey-Gymnasium in Wiesbaden. Nach dem Umzug meiner Eltern nach Erlangen wurde meine Ausbildung am dortigen naturwissenschaftlichen Ohm-Gymnasium fortgeführt, wo ich am 28. Juni 1969 das Reifezeugnis erhielt.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen mit dem Studium der Chemie, das ich nach der am 18. Juli 1972 bestandenen Diplomvorprüfung ab Wintersemester 1972/73 an der Ludwig-Maximilians-Universität München fortsetzte. Dort legte ich im April 1975 die mündliche Diplomhauptprüfung in Chemie mit der Fächerverbindung Anorganische Chemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie und Biochemie ab. Die Diplomarbeit mit dem Thema "Die rifampicininduzierte Synthese von Dinucleosidtetraphosphat", die ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. R. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München anfertigte, beendete ich am 30. Juli 1976.

Anschließend führte ich ebenfalls unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. R. Hartmann zwischen September 1976 und Dezember 1979 an demselben Institut die vorliegende Dissertation aus.

Seit Dezember 1976 bin ich mit der Studienrätin Susanne Kessler, geb. Michels verheiratet.

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090